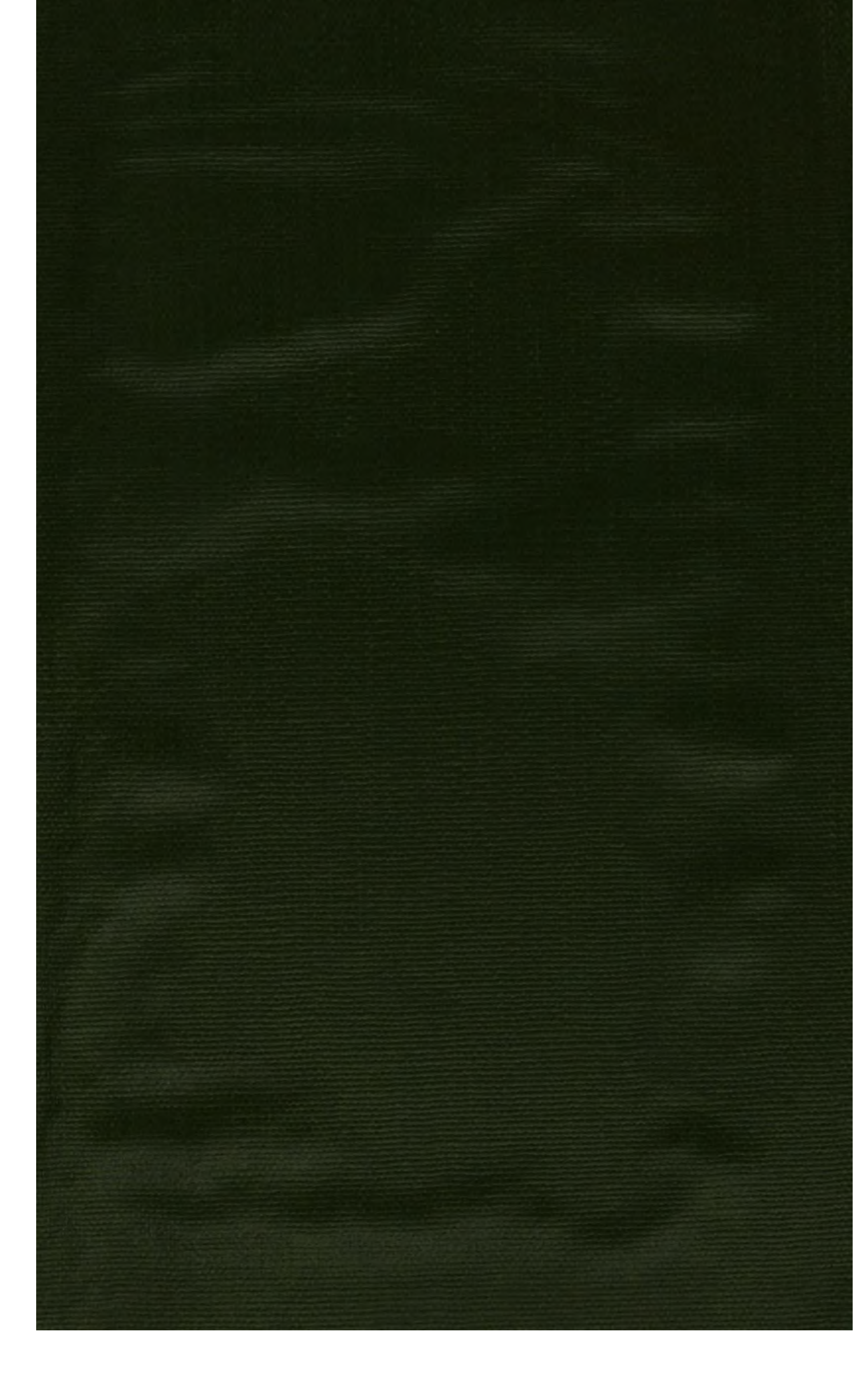
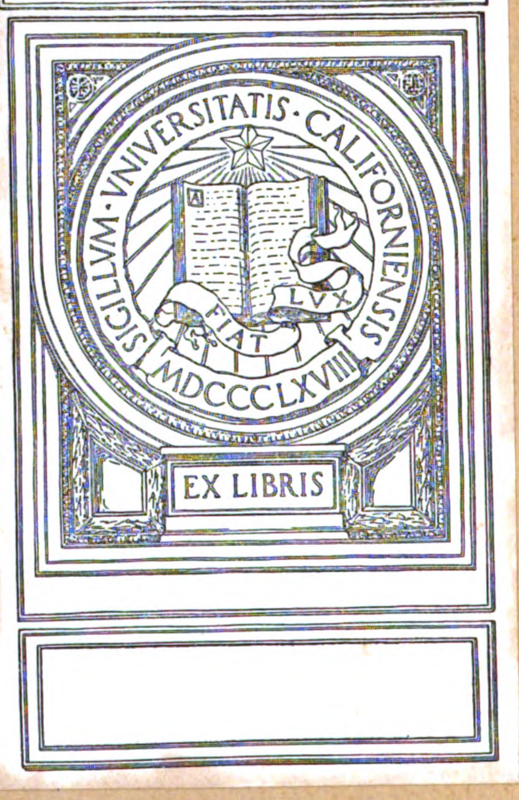



SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS

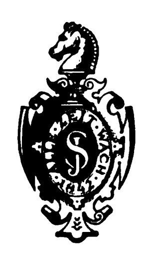
Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

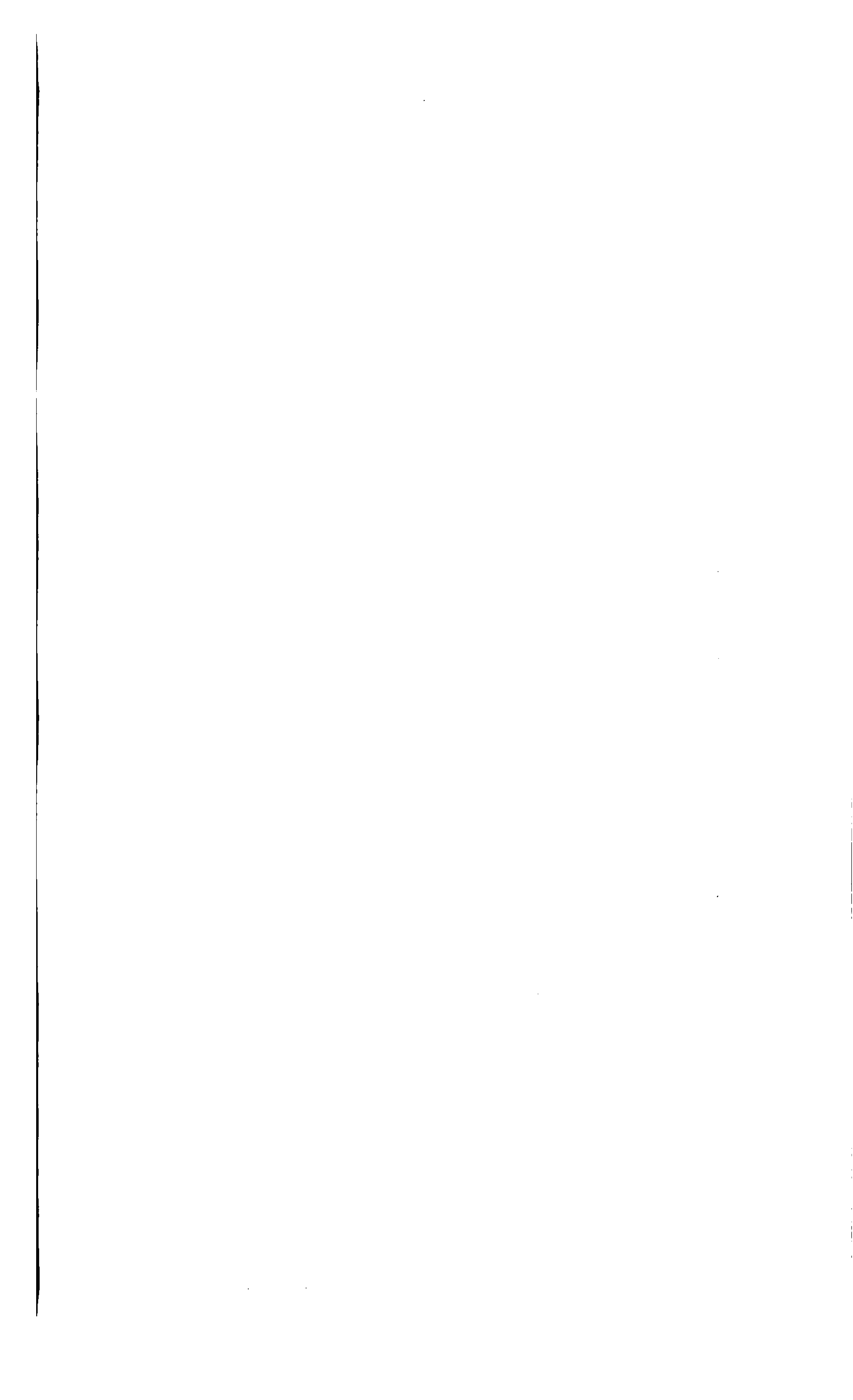
Hundertsiebenzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Druck von Friedr Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.



Über das Verhalten neutraler Natriumcaseinate bei Membranhydrolyse.

Von

Wilhelm Starlinger.

(Aus dem Universitätslaboratorium für physikalisch-chemische Biologie in Wien).

(Eingegangen am 13. Januar 1926.)

I. Einleitung und Fragestellung.

Nachdem die ersten physiko-chemischen Messungen[1]) mit exakter Methodik an neutralen Alkalicaseinatlösungen mit Hilfe der Basenbindungsbestimmung ein Äquivalentgewicht des Caseins von 1135, mit Hilfe der Bestimmung des Äquivalentleitvermögens im Rahmen der *Ostwald-Walden*schen Wertigkeitsregel ein Molekulargewicht von 4 — 6 × 1135 ergeben hatten, wurde in Fortführung dieser Untersuchungen[2]) aus dem äquivalenten Leitvermögen einerseits mit Hilfe der graphischen Extrapolation von λ_∞ die Beweglichkeit des Caseinations im neutralen Caseinat mit rund 30 bestimmt, andererseits mittels der Basenbindungsbestimmung und bei Annahme der Gültigkeit der *Ostwald*schen Regel das Äquivalentgewicht mit 1000, das Molekulargewicht mit rund 3 × 1000 festgesetzt. Daraus formulierte sich die physikalisch-chemische Konstitution neutraler Alkalicaseinate nach dem Typus $Na_3(\text{Caseinat})'''$ bei fehlendem Caseinatüberschuß bzw. nach dem Typus $Na_3(\text{Caseinat})'''(\text{Casein})$ bei Caseinüberschuß im Sinne der Bildung eines Komplexsalzes ohne Wertigkeitsänderung.

In Anbetracht der ausschlaggebenden Rolle der Leitfähigkeitsmessung für die Gewinnung der vorangestellten grundlegenden Ergebnisse und deren Bedeutung für die allgemeine Kolloidchemie der Eiweißkörper mußte jede Erkenntnis, die den Wert der Leitfähigkeitsmessung in Caseinatlösungen in Frage zu stellen schien, besondere Beachtung gewinnen. Da nun in solche Richtung zielende Mitteilungen von Seiten *Polanyis* und seiner Mitarbeiter[3]) vorliegen, wurde es im folgenden

---

[1]) *Laqueur* und *Sackur*, Beitr. z. chem. Phys. u. Path. **3**, 1903.

[2]) *Pauli*, diese Zeitschr. **70**, 1915; *Pauli* und *Matula*, ebendaselbst **99**, 1919; ferner *Pauli*, Kolloidchemie der Eiweißkörper **1**, 81 ff. Dresden, Steinkopf, 1920.

[3]) *Mandoki* und *Polanyi*, diese Zeitschr. **104**, 1920; *Fischenich* und *Polanyi*, Kolloid-Zeitschr. **36**, 1925.

auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Prof. *Pauli* unternommen, die zu dieser Fragestellung vorgebrachten Befunde und Folgerungen einer neuerlichen theoretischen und experimentellen Prüfung zu unterziehen.

In der nun folgenden Literaturübersicht konnte wegen des vollen Verständnisses der Fragestellung eine gewisse Ausführlichkeit der Darstellung nicht vermieden werden.

Mandoki und *Polanyi* stellten fest:

1. daß bei Fischblasendialyse neutraler Alkalicaseinatlösungen „massenhaft leitende Bestandteile austreten", die keine Eiweißreaktion geben und einen „fast völlig" fermoltitrierbaren Stickstoffgehalt aufweisen,

2. daß das Leitvermögen der Lösung dieser „fraglichen Stoffe" beim Stehen spontan anwächst.

Sie zogen daraus den Schluß, daß beim „Auflösungs- bzw. Neutralisationsprozeß" des Caseins „Zersetzungsprodukte" entstehen, die sich spontan weiter zersetzen, und lehnten daher die eingangs formulierte Auffassung *Paulis* ab, daß der Rest des Leitvermögens neutraler Alkalicaseinate, der durch das Natrium nicht gedeckt wird, auf den negativen Elektrizitätsträger, das Caseination entfällt: „Die Leitfähigkeit der neutralen Caseinlösungen beweist nicht, daß das in Lösung befindliche Eiweiß ein guter Leiter ist, es steht vielmehr fest, daß die Leitfähigkeit dieser Lösungen durch Zersetzungsprodukte des Caseins verursacht wird."

Demgegenüber machte *F. Plattner*[1]) in einer unter *Paulis* Leitung ausgeführten Untersuchung geltend, daß weder über die primäre Reinheit des verwendeten Ausgangspräparats (leichte Zersetzlichkeit des Caseins!) und die Art des Lösungsvorganges (Zusatz zu hochkonzentrierter Lauge!), noch über die Abwehr sekundärer bakterieller Zersetzung von *Mandoki* und *Polanyi* Angaben gemacht wurden und stellte fest:

1. daß die Leitfähigkeit von mit käuflichem *Merck*schen Casein geschütteltem Wasser erheblich ansteigen kann,

2. daß die Leitfähigkeit entsprechend aus elektrodialysiertem Casein hergestellter und unter Toluol aufbewahrter Caseinatlösungen innerhalb kürzerer Beobachtungsdauer keine Zunahme erfährt,

3. daß bei Gleichgewichtsdialysen in Kollodiumsäckchen und bei Campheranwesenheit die Leitfähigkeit der Außenflüssigkeit die der Innenflüssigkeit bei Reduktion auf gleiches Volumen um ein Mehrfaches überschreitet,

4. daß ein geringer Stickstoffübertritt in die Außenflüssigkeit nachweisbar wird, der 1 Proz. des Stickstoffgehalts des verwendeten Gesamtcaseinats nicht übersteigt und immer schwach positiven Eiweißreaktionen entspricht.

Plattner zog daraus den Schluß, daß in entsprechend bereiteten und behandelten Caseinlösungen nur sehr geringe Mengen von Abbauprodukten auftreten, die als Ursache für die Leitfähigkeit reiner Caseinatlösungen nicht in Frage kommen können, während das hohe Leitvermögen der Außenflüssigkeit auf den durch Membranhydrolyse bedingten Durchtritt von Natrium durch die Membran bei gleichzeitiger Ausfällung der entsprechenden Caseinmengen innen bezogen werden muß.

---

[1]) *Plattner*, Kolloid-Zeitschr. **33**, 1923.

Darauf berichteten *Fischenich* und *Polanyi* (l. c.), unter Ablehnung dieser Auffassung *Plattners* als der experimentellen Begründung entbehrend, über neue Versuche, in deren Verlauf sie beobachteten:

1. daß im Verlaufe der Dialyse in der Dialysierzelle kein Caseinat ausfällt und der Stickstoffgehalt der Innenflüssigkeit keine Änderung erfährt,

2. daß nach Abschluß von Dauer- und Gleichgewichtsdialysen das Leitvermögen der Innenflüssigkeit, verglichen mit dem Leitvermögen einer frisch hergestellten Caseinatlösung gleicher Stickstoffkonzentration nur etwa das halbe Ausmaß der letzteren erreicht,

3. daß der Trockenrückstand der Außenflüssigkeit zu drei Viertel bis zwei Drittel aus organischer Substanz besteht, die keine Eiweißreaktion gibt,

4. daß das Leitvermögen des Caseinats in Gelatine-Sol und Gelatine-Gel gleichbleibt.

Aus diesen Feststellungen zogen die Autoren folgende Schlüsse:

Aus 1. und 2. Die Tatsache, daß Caseinlösungen einen beträchtlichen Teil ihres Leitvermögens einbüßen können, ohne daß dabei Casein ausfällt, genügt, um den Anteil, den das Casein an der „elektrischen Leitung hat, ganz unsicher erscheinen zu lassen".

Aus 3. „Nichts spricht also gegen die Annahme, daß das Leitvermögen des Außenwassers durch organische Salze bedingt ist, welche aus der Caseinlösung heraus diffundieren."

Aus 4. Wenn der Anteil des auf Kolloidionen entfallenden Leitvermögens in Gallerten fortfallen muß, ändert sich die Leitfähigkeit nicht, es nehmen also Caseinionen an der Leitung keinen Anteil.

Die grundsätzliche Kritik dieser im vorstehenden wichtigsten wiederholten Literaturangaben muß vor allem betonen, daß die tatsächlich erhobenen Befunde zu den weitgehenden Schlüssen, die *Polanyi* und seine Mitarbeiter ziehen, nicht berechtigen; denn die Feststellung, daß in Caseinatlösungen bei Membrandialyse leitende Zerfallsstoffe austreten, erlaubt an sich verständlicherweise keinesfalls den Schluß, daß diese Elektrolyte in den Caseinatlösungen bereits ursprünglich als solche anwesend waren. Im Gegenteil erscheint schon a priori die Möglichkeit membranhydrolytischer Vorgänge und dadurch bedingter, erst durch die Dialyse ausgelöster Entstehung dieser Stoffe viel naheliegender. Die allgemeine Stellungnahme zu den Arbeiten *Polanyis* und seiner Mitarbeiter darf daher in folgender Weise gekennzeichnet werden: Wenn der experimentelle Nachweis erbracht werden kann, daß neutrale Alkalicaseinatlösungen bei langer Beobachtungsdauer einerseits keine Änderung ihres Leitvermögens erleiden, andererseits keinen Zersetzungsvorgängen unterliegen, so können die Befunde der erwähnten Autoren lediglich als Beitrag zur Frage der membranhydrolytischen Beeinflussung neutraler Alkalicaseinate Beachtung finden, keinesfalls aber für die Beurteilung der Ursachen ihres autochthonen Leitvermögens Bedeutung gewinnen.

Der erste Abschnitt des experimentellen Teiles dieser Arbeit wird also zu untersuchen haben, ob aus reinstem (elektrodialysiertem) Casein in verdünnter Lauge hergestellte Caseinatlösungen bei sicherer Vermeidung bakterieller Zersetzung (Toluol) während mindestens mehrmonatiger Beobachtung ein konstantes Leitvermögen bewahren und keinen autolytischen Zerfall erleiden; die Grundlage des Nachweises fehlender Autolyse darf aber als gegeben angenommen werden, wenn im Verlauf dieses Zeitabschnitts keine inkoagulablen Stickstoffkörper auftreten.

II. Das Verhalten neutraler Alkalicaseinate bei langer Beobachtungszeit.

1. Die Reinheit des Merckschen Caseinpräparats „nach Hammarsten".

Plattner fand nach 24stündigem Schütteln des Präparats mit Wasser unter Toluol eine spezifische Leitfähigkeit des überstehenden Wassers von $k = 4{,}3 \cdot 10^{-5}$, *Fischenich* und *Polanyi* stellten bei Aufschwemmung von 2 g Casein in 100 ccm Wasser eine solche von $k = 1{,}1 \cdot 10^{-5}$ fest.

In eigenen Versuchen stieg die spezifische Leitfähigkeit des Schüttelwassers nach Eintragung von 10,0 g Casein in 100 ccm Wasser in Versuch A nach achtstündigem Schütteln unter Toluol auf $k = 1{,}31 \cdot 10^{-4}$ bzw. nach weiterem 24stündigen Stehenlassen auf $k = 1{,}47 \cdot 10^{-4}$, in Versuch B nach viertelstündigem Schütteln auf $1{,}30 \cdot 10^{-4}$ an; die ursprüngliche Wasserleitungsfähigkeit betrug $k = 3{,}46 \cdot 10^{-6}$[1]).

Nach Elektrodialyse der vereinigten Proben von 150stündiger Dauer zwischen Graphitelektroden im *Pauli*schen Apparat[2]) bei 220 Volt unter Toluol wurde eine spezifische Leitfähigkeit des überstehenden Wassers von $k = 5{,}61 \cdot 10^{-6}$ erreicht, die auch bei weiterer Fortführung der Elektrodialyse nicht mehr herabgedrückt werden konnte[3]).

Diese Befunde erlauben also die Feststellung, daß das *Merck*sche Caseinpräparat quantitativ schwankende, unter Umständen jedenfalls beträchtliche Mengen leitfähiger wasserlöslicher Stoffe enthalten kann und daher für Untersuchungen vorliegender Art erst nach vorausgehender entsprechender Reinigung oder unter Berücksichtigung seines Reinheitsgrades Verwendung finden darf. Diese Forderung *Plattners*, die auch in der Mitteilung *Polanyis* und *Fischenichs* anscheinend keine Berücksichtigung fand, darf daher als neuerdings experimentell begründet angesehen werden.

[1]) Die spezifische Leitfähigkeit in gleicher Weise unter Toluol geschüttelten und aufbewahrten Wassers stieg von $k = 4{,}08$ auf $4{,}21 \cdot 10^{-6}$.

[2]) Von F. Köhler, Leipzig.

[3]) In einem zweiten Versuch wurde bei Anwendung eines kleineren Apparats und bei Verarbeitung von etwa 5,0 g Casein eine spezifische Leitfähigkeit von $k = 4{,}44 \cdot 10^{-6}$ erzielt.

2. *Die Herstellung und Charakteristik der eigenen Caseinatlösungen.*

Das elektrodialytisch gereinigte Casein wurde abgefiltert, mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen, 12 Stunden bei 40° getrocknet und ergab ein grobkörniges, gelbliches Pulver.

Zur Bereitung der Lösung wurden je 4,0 g Casein nach vorheriger Aufschwemmung in etwa 150 ccm Wasser mit 20 ccm n/10 NaOH versetzt, danach auf 200 ccm Gesamtmenge aufgefüllt und unter Toluol bis zur optimalen Lösung des Caseins mehrstündig geschüttelt; eine völlige Lösung des zugesetzten Caseins gelang jedoch niemals, da immer ein Bodensatz aus größeren, zusammengeballten Bröckeln zurückblieb und sedimentierte. Die fertige, von nicht gelöstem Casein und Toluol abfiltrierte Lösung war fast völlig klar und zeigte nur im durchfallenden Licht geringe Opaleszenz; die weitere Aufbewahrung erfolgte unter Toluol.

Die in den Hauptversuchsreihen verwendeten Caseinatlösungen hatten folgende Eigenschaften:

Tabelle I.

Caseinat	Trockengehalt g-Proz.	Gesamtstickstoff g-Proz.	Nicht koagulabler Stickstoff	Aus Stickstoff berechneter Eiweißgehalt	Na_2 g-Proz.	$\frac{K_{25^0}}{10^{-4}}$	p_H
A	1,61	0,248	θ	1,55	0,0228	4,98	7,05
B	—	0,266	θ	1,66	—	5,15	6,89
C	—	0,273	θ	1,71	—	5,84	—

Das Casein der Caseinatlösungen A und B wurde in der ersten, das Casein der Lösung C in der zweiten Elektrodialyse gereinigt.

Angewandte Methodik: Der Natriumgehalt wurde nach *Pregl*[1]), der Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl* in der Modifikation von *Pregl*, der Trockengehalt in der üblichen Weise bestimmt; als inkoagulabler Stickstoff sind Stickstoffkörper, die durch Trichloressigsäure in 10proz. Endkonzentration nicht gefällt werden, zu verstehen; die H-Ionenkonzentration wurde elektrometrisch gemessen.

Das beobachtete spezifische Leitvermögen steht im Einklang mit den Angaben der früheren Autoren, die H-Ionenkonzentration entspricht dem Neutralpunkt (während *Polanyi* eine leicht saure Reaktion, entsprechend $p_H = 6$, beobachtete), gravimetrisch und mit Hilfe der

[1]) Zur Kritik der Natriumbestimmung in der vorliegenden Versuchsanordnung muß bemerkt werden, daß in Anbetracht des nicht unbeträchtlichen Phosphorgehalts des Caseins (= 0,83 Proz. nach *Hammarsten*) der durch Phosphor gedeckte Teil des Aschennatriums als Pyrophosphat ($Na_4P_2O_7$) und nur der restliche Teil als Sulfat (Na_2SO_4) zur Bestimmung gelangt; trotzdem wurde in den vorliegenden Bestimmungen das Natrium als Sulfat berechnet, da sein prozentischer Anteil im Sulfat (= 32,4 Proz.) und Pyrophosphat (= 34,5 Proz.) zu wenig differiert, um wesentliche Fehler nach sich zu ziehen. Im übrigen darf schon hier auf die gute Übereinstimmung zwischen den (in der Innen- *und* Außenflüssigkeit der Dialysierversuche) *gefundenen* und den *berechneten* Natriumwerten hingewiesen werden.

Stickstoffbestimmung (Multiplikationsfaktor = 6,25) gefundener Eiweißgehalt, sowie gefundener und berechneter (0,0230 g-Proz.) Na-Gehalt zeigen gute Übereinstimmung; nicht koagulabler Stickstoff wurde nicht gefunden.

3. Das Verhalten der Caseinatlösungen.

Plattner fand innerhalb elftägiger Beobachtungszeit keine Änderung des Leitvermögens seiner Caseinatlösung.

In eigener Prüfung bei um vieles verlängerter Beobachtungszeit betrug die spezifische Leitfähigkeit von Caseinat A nach der Herstellung $k = 4{,}98 \cdot 10^{-4}$, nach 99 Tagen $k = 5{,}20 \cdot 10^{-4}$. Der gleichzeitige Versuch der Feststellung nicht koagulablen Stickstoffs hatte immer ein völlig negatives Ergebnis.

Diese Befunde erlauben also die Aussage, daß entsprechend hergestellte und aufbewahrte neutrale Alkalicaseinatlösungen keine zeitliche Änderung des Leitvermögens und keinen Eiweißzerfall erfahren. Die von *Mandoki* und *Polanyi* übernommene Angabe *Robertsons*, daß genauestens neutralisierte Caseinlösungen sich beim Stehen bereits in kurzer Zeit zersetzen und leitfähige Substanzen abspalten, darf also für das hier eingeschlagene Verfahren der Caseinatbereitung berechtigte Ablehnung finden, während die Beobachtung *Plattners* volle Bestätigung und Erweiterung erfährt. Die erste Fragestellung vorliegender Arbeit darf mithin in dem Sinne entschieden werden, daß neutralen Natriumcaseinatlösungen eine konstante und reproduzierbare Leitfähigkeit zukommt.

In der Tat scheint auch *Polanyi* in der neueren Arbeit mit *Fischenich* sich dieser Auffassung zu nähern, nur wird der Standpunkt vertreten, daß es nicht die Leitfähigkeit des Caseinations sei, die darin mit zum Ausdruck komme, sondern die von anderen im Caseinat entstandenen Ionen.

Nach dieser Feststellung kann also in die Besprechung der zweiten Hauptfrage nach Ergebnis und Deutung der Dialysenversuche eingegangen werden.

III. Das Verhalten neutraler Alkalicaseinatlösungen bei membrandialytischer Beeinflussung.

Die Betrachtung der zu dieser (durchaus selbständigen und von der ersten streng zu trennenden zweiten) Fragestellung bereits vorliegenden Befunde *Plattners* sowie *Polanyis* und seiner Mitarbeiter erlaubt zunächst folgende Angaben:

1. Die Berechnung des im Verlauf der Dialyse entstandenen Gesamtleitungsvermögens durch Reduktion auf das Ausgangsvolumen der Caseinatlösung, welche in den Mitteilungen der erwähnten Autoren nicht durchgeführt wurde, ergibt ausnahmslos eine deutliche Erhöhung

gegenüber dem Ausgangsleitvermögen; die aus den Tabellen *Plattners* und *Fischenich-Polanyis* (die Mitteilung *Mandoki-Polanyis* darf übergangen werden) in dieser Weise berechneten Werte sind in folgender Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Nr.	Dauer Stunden	Reduzierte K 10^{-4} innen	Reduzierte K 10^{-4} außen	Gesamt-K 10^{-4}	K der Ausgangslösung 10^{-4}	Gesamt-K in Proz. der K der Ausgangslösung
I	48	4,03	22,00	26,03	5,90	441
II	48	2,91	16,95	19,86	5,70	348
III	24	2,66	8,33	10,99	6,90	185
IV	24	3,40	14,40	14,80	5,70	259
19	67	4,07	3,53	7,60	5,59	136
20	23	3,78	3,05	6,83	5,63	121
21	23	4,04	3,00	7,04	5,63	125
22	25	4,78	2,17	6,95	5,74	121
23	25	5,01	2,01	7,02	5,74	122
27	23	5,04	1,78	7,82	5,30	128
28	46	4,30	3,01	7,31	5,30	138
29	46	4,29	2,69	6,98	5,41	129
30	57	3,62	3,87	7,49	5,41	139

Die Dialysen I bis IV beziehen sich auf die Tabelle *Plattners*, die Dialysen 19 bis 30 auf die Tabelle IIIa *Fischenich-Polanyis*.

Die Erhöhung beträgt also bei den Campherdialysen *Plattners* das Zwei- bis Vierfache, bei den Toluoldialysen *Fischenich-Polanyis* $^1/_5$ bis $^2/_5$ des Ausgangsleitvermögens und steht bei beiden in deutlicher Abhängigkeit von der Dialysendauer; die außerordentliche Erhöhung in den Versuchen *Plattners* legt die Vermutung nahe, daß die Campheranwesenheit keinen sicheren Schutz gegen bakterielle Zersetzungsvorgänge gewährt.

2. Die methodische Beurteilungsgrundlage, die bei den Versuchen *Fischenich-Polanyis* angewendet wurde, kann nicht angenommen werden, denn sie vergleicht das Leitvermögen der Dialysate mit dem Leitvermögen einer frisch hergestellten Caseinatverdünnung gleichen Stickstoffgehalts, wobei das Vergleichsprinzip also nur den Stickstoff, nicht aber das Natrium berücksichtigt, welches im Dialysat auf Grund teilweisen Übertritts in die Außenflüssigkeit verständlicherweise geringere Konzentration besitzen muß. Daß aber Alkali in die Außenflüssigkeit übertritt, wird schon aus den angegebenen Trockenrückstandsanalysen *Fischenich-Polanyis* in der Außenflüssigkeit wahrscheinlich, welche den anorganischen Anteil mit rund 40 Proz. bestimmten.

3. Die Angaben *Fischenich-Polanyis* erscheinen weiterer Aufklärung bedürftig, da einerseits der Stickstoffgehalt der Ionenflüssigkeit keine Änderung erleiden soll, andererseits der Trockenrückstand der

Außenflüssigkeit zu 3/4 bis 2/3 aus „organischer Substanz" besteht, über deren Natur zwar nur angegeben wird, daß sie keine Eiweißreaktion gibt, die aber im Rahmen der Versuchsbedingungen wohl aus Stickstoffkörpern bestehen muß.

4. „Die Tatsache, daß Caseinlösungen einen beträchtlichen Teil ihres Leitvermögens einbüßen können, ohne daß Casein ausfällt", genügt — unter Annahme der Tatsächlichkeit dieser Angaben — *keinesfalls*, „um den Anteil des Caseins an der elektrischen Leitung ganz unsicher erscheinen zu lassen", denn bei teilweiser Entfernung des Natriums können die entsprechenden Caseinmengen durch Bildung der bei Caseinüberschuß entstehenden Caseincaseinate in Lösung gehalten werden; dieses ist eine ganz allgemeine Erscheinung, welche sich bei allen wasserunlöslichen Eiweißkörpern findet.

5. Was schließlich die letzte Beweisführung *Fischenich-Polanyis* anlangt, daß die Leitfähigkeit eines kolloiden Ions durch Aufnahme in eine Gallerte und dadurch bedingte Aufhebung des Ionentransports Null werden müßte, während eine Änderung der Caseinatleitfähigkeit durch Einbringung in Gallerten tatsächlich nicht beobachtet werden konnte, so kann ihr auf Grund von Untersuchungen am Institut keine Beweiskraft zugemessen werden, denn in diesen Fällen wird die Leitfähigkeit wohl durch Wassertransport und Überführung der Außenionen übernommen, da am Institute bei Ceroxydsolen und an Seifensolen von *Mc Bain* und *M. E. Laiing*[1]) quantitativ festgestellt wurde, daß eine Änderung der Leitfähigkeit durch die Erstarrung nicht stattfindet.

Die eigene experimentelle Prüfung gestaltete sich folgendermaßen:

Allgemeine Methodik.

1. Als Membranen fanden Verwendung Fischblasen, Kollodiumsäckchen, Pergamentschläuche verschiedener Herkunft und Pergamenthülsen von Schleicher & Schüll; alle benutzten Membranen wurden mit Hämoglobin geprüft und erwiesen sich bei mehrtägiger Dialyse als vollkommen dicht.

2. Die Dialysen liefen ausnahmslos als Gleichgewichtsdialysen; die Dauer schwankte je nach der Dichte der verwendeten Membran zwischen 24 und 140 Stunden. Die Schläuche wurden möglichst luftdicht durch ein eingebundenes, zugekorktes Glasrohr abgeschlossen, um das Ausmaß der Flüssigkeitsverschiebung zu beschränken; die Außenflüssigkeit wurde abgedeckt.

Die Menge der Ausgangsinnenflüssigkeit schwankte zwischen 10 und 30 ccm, die des Außenwassers zwischen 50 und 100 ccm. Die Wasserverschiebung wurde durch Wägung der Außenflüssigkeit nach Abschluß der Dialyse bestimmt.

Als Antiseptikum kam teils Campher, teils Toluol zur Verwendung.

3. In einer Reihe von Versuchen wurden die quantitativen Stickstoff- und Natriumanalysen sowohl in der Innen- wie Außenflüssigkeit zum Zwecke

[1]) Transact. Chem. Soc. London **117**, 1506, 1920.

der Kontrolle durchgeführt; in den restlichen Versuchen, in denen nur *eine* Flüssigkeit analysiert wurde, ergab sich die Konzentration der anderen durch Differenzrechnung. Diese Werte sind in Tabelle III, welche die Messungsergebnisse aller durchgeführten Dialysen enthält, durch Sterne gekennzeichnet.

Spezielle Methodik.

1. Verwendete Caseinatlösungen.

Caseinat A in Dialyse I bis VI; Alter am Tage des Abschlusses von Dialyse V 18 Tage, von Dialyse VI 127 Tage (inkoagulabler Stickstoff = 0 $k = 5{,}33 \,.\, 10^{-4}$).

Caseinat B in Dialyse VII bis X; Alter am Tage des Abschlusses von Dialyse X 19 Tage; Caseinat C in Dialyse XI bis XII; Alter 4 Tage.

2. Verwendete Membranen.

Fischblasen in Dialyse I bis II; Kollodiumsäckchen in Dialyse III; Pergamentschläuche in Dialyse IV, V, VII bis X; Pergamenthülsen von Schleicher-Schüll in Dialyse VI, XI, XII.

3. Verwendete Antiseptica.

Campher in Dialyse I bis V; Toluol in Dialyse VI bis XII.

Tabelle III.

Nr	Dauer der Dialyse Stdn.		Mengen in ccm Beginn	Ende	Eiweißtrübung	Gesamtstickstoff g	Nicht koagulabler Stickstoff g	Na g	K_{25^0} 10^{-4}	p_H
I	28	i	20	34*	3 +	0,0449	0		2,37	6,45
		a	100	86		0,0017	0		0,65	7,86
II	47	i	20	52*	2 +	0,0369	0,0281		2,53	6,70
		a	100	68		0,0114	0,0102		1,62	7,20
III	120	i	20	27*	+	0,0455*			5,60	7,10
		a	100	93		0,0037			1,27	8,12
IV	96	i	20	42*	3 +	0,0368*	0,0040		2,78	7,08
		a	100	78		0,0124	0,0047		2,48	7,72
V	140	i	20	31*	+	0,0145	0,0127		3,24	7,32
		a	100	89		0,0338	0,0340		3,33	7,58
VI	72	i	30	30,5*	3 +	0,0700*	0,0012	0,0052	3,96	
		a	60	59,5	±	0,0026	0,0010	0,0017*	0,87	
VII	48	i	10	18*	3 +	0,0173	0,0011	0,0013	1,36	6,51
		a	50	42	±	0,0092	0,0017	0,0010*	0,65	6,91
VIII	48	i	18	18*	3 +	0,0256	0,0004	0,0016	1,79	6,65
		a	50	50	±	0,0240	0,0040	0,0026	1,20	6,65
IX	96	i	20	15*	2 +	0,0156	0,0011	0,0015	1,75	6,62
		a	50	55	±	0,0374	0,0044	0,0031	1,44	6,77
X	96	i	20	15,5*	2 +	0,0183	0,0012	0,0016	1,75	6,57
		a	50	54,5	±	0,0338	0,0027	0,0031	1,28	6,88
XI	52	i	30	32,5*	3 +	0,0811*	0,0014	0,0050	3,83	
		a	100	97,5		0,0008	0,0008	0,0019*	0,64	
XII	52	i	30	30*	3 +	0,0807*	0,0008	0,0048	3,78	
		a	100	100		0,0012	0,0012	0,0021*	0,58	

3 + bedeutet milchige Trübung, 2 + deutliche Trübung, + schwache Trübung, ± deutliche Opaleszenz.

Vor der kritischen Bewertung der verzeichneten Befunde darf darauf hingewiesen werden, daß die gute Übereinstimmung zwischen den gefundenen Additionsmengen des jeweils maßanalytisch in der Innen- und Außenflüssigkeit ermittelten Stickstoffs und Natriums mit den bekannten Ausgangsmengen die im vorigen erwähnte Differenzrechnung, sowie die vernachlässigte Ungenauigkeit der Natriumbestimmung rechtfertigt. Die Belege ergeben sich aus Tabelle IIIa.

Tabelle IIIa.

Nr.	Gesamt-N in g		Gesamt-Na in g	
	berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
I	0,0492	0,0466	—	—
II	0,0492	0,0483	—	—
V	0,0492	0,0483	—	—
VII	0,0266	0,0265	—	—
VIII	0,0481	0,0496	0,0042	0,0042
IX	0,0532	0,0530	0,0046	0,0046
X	0,0532	0,0521	0,0046	0,0047

Die Durchsicht der Haupttabelle III erlaubt zunächst folgende unmittelbar ersichtlichen Feststellungen:

1. Es kam ausnahmslos zu mehr oder weniger ausgeprägter Eiweißtrübung der Innenflüssigkeit.

Hinsichtlich des Charakters dieser Trübung sei bemerkt, daß sie sowohl während als auch in der Regel nach der Dialyse stabil blieb, also keine Neigung zur spontanen Ausflockung und Sedimentierung zeigte; selbst mehrstündiges Zentrifugieren ergab nur geringe Mengen Bodensatz; nur in den Fällen besonders starker Trübung (+++) konnte mehrere Tage nach Abschluß der Dialyse der Beginn einer Spontansedimentierung mit teilweiser Klärung der überstehenden Flüssigkeit beobachtet werden.

In der Außenflüssigkeit wurde öfters eine deutliche Opaleszenz (±) beobachtet, zu Trübungen jedoch kam es auch in Fällen ausgeprägten Durchtritts koagulabler Stickstoffkörper niemals.

Auf die Begleitumstände dieser aufgetretenen Eiweißtrübungen und die Bedingungen ihres Auftretens wird nach Besprechung der chemischen Analysenergebnisse zurückzukommen sein.

2. Die chemische Analyse der *Stickstoffkörper* ergab: 1. daß fast ausnahmlos im Verlauf der Dialysen wechselnde Mengen nichtkoagulablen Stickstoffs auftraten, die namentlich bei Campheranwesenheit ein ungewöhnliches Ausmaß erreichten und eine deutliche Abhängigkeit von der Zeitdauer der Dialysen erkennen ließen; 2. daß regelmäßig durch die Membran in die Außenflüssigkeit inkoagulable, öfters auch koagulable Stickstoffkörper übertraten, deren Mengen in proportionalem Verhältnis zur Membrandurchlässigkeit und Dialysendauer standen (Tabelle IIIb).

Tabelle IIIb.

Nr.	Entstandener inkoagulabler N	Diffundierter Gesamt-N	Diffundierter koagulabler N
I	—	3,5	3,5
II	77,8	23,2	2,4
III	—	7,5	—
IV	17,6	25,2	15,6
V	94,5	68,7	θ
VI	3,0	3,7	2,2
VII	10,5	34,5	28,6
VIII	9,2	49,9	41,6
IX	10,3	66,5	58,3
X	7,3	63,5	58,5
XI	2,9	1,0	θ
XII	2,4	1,5	θ

Die angegebenen Werte sind in Prozenten des Gesamtstickstoffs der jeweils verwendeten Ausgangscaseinatmenge ausgedrückt.

Zum Verständnis der Nebentabellen (IIIa bis IIIg) müssen jeweils die entsprechenden Stäbe in der Haupttabelle III eingesehen werden.

3. Die chemische Analyse des *Natriums* konnte regelmäßig Membranpassage desselben feststellen, wobei ebenfalls Dialysendauer und Membrandurchlässigkeit ausschlaggebenden Einfluß nahmen; die Verteilung des Natriums auf Innen- und Außenflüssigkeit erfolgte bei genügender Membrandurchlässigkeit so, daß die absoluten Innenmengen hinter den Außenmengen zurückblieben (Tabelle IIIc).

Tabelle IIIc.

Dialysen Nr.	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Diffundiertes Natrium in Proz. d. Gesamtnatriums der verwendeten Ausgangs-Caseinatmenge .	24,6	43,5	64,3	67,4	67,4	27,5	30,4

Die geringe Durchlässigkeit der Pergamentmembranen von *Schleicher & Schüll* ist auch in Tabelle IIIb aus den außergewöhnlich geringen diffundierten Stickstoffmengen ersichtlich.

4. Die *Hydroxylionen* zeigten ein gesetzmäßiges Verhalten im Sinne einer geringeren Konzentration in der Innenzelle.

5. Die Feststellung des *Leitvermögens* ergab ausnahmslos einen Übertritt leitender Stoffe in die Außenflüssigkeit, dessen Ausmaß in Proportion zur Dialysendauer und Membrandurchlässigkeit sowie zum Umfang des Auftretens inkoagulablen Stickstoffs stand.

Die wechselseitige Gegenüberstellung dieser Befunde erlaubt weiterhin folgende Feststellungen und Schlüsse:

1. Das Auftreten von sichtbaren Eiweißfällungen im Dialysat ist abhängig von dem Ausmaß des Eiweißzerfalls überhaupt, indem bei Bildung größerer Mengen inkoagulablen Stickstoffs (Dialyse II und V) verständlicherweise schon aus diesem Grunde keine oder nur geringe Eiweißtrübung entstehen kann (in Dialyse III wurde die Bestimmung des nicht koagulablen Stickstoffs leider nicht durchgeführt, in Dialyse I und IV wurde bei starker Trübung kein oder ein verhältnismäßig geringer Eiweißzerfall beobachtet, in Dialyse VI bis XI schließlich braucht die Möglichkeit einer Verhinderung der Eiweißtrübung durch zu großen Eiweißzerfall auf Grund seines geringen Ausmaßes nicht in Erwägung gezogen werden); vor allem aber ist die Trübung der Innenflüssigkeit bestimmt von dem Ausmaß des Natriumübertritts in die Außenflüssigkeit, indem das Dialysat bei genügendem Natriumverlust regelmäßig mehr oder weniger starke Trübungen erfährt (Dialyse VI bis XII).

In diesem Zusammenhang darf darauf hingewiesen werden, daß der ausgeprägte Durchtritt koagulabler Eiweißkörper durch absolut hämoglobindichte Membranen (Dialyse VII bis X) bzw. die Verhinderung eines stärkeren Caseineiweißdurchtritts nur durch solche Membranen, welche auch die inkoagulablen N-Körper und das Natrium nur schwer durchtreten lassen (Dialyse VI, XI bis XII), auf ein sehr kleines Molekulargewicht des Caseins hinweisen, wie ja auch die Untersuchungen *Paulis* auf ein solches von 3000 im neutralem Caseinat hindeuten, welcher Wert um ein Vielfaches hinter dem der anderen Eiweißkörper zurücksteht. Auch *E. J. Kohn* und *J. L. Hendry* (Journ. of gen. phys. 5, 1923) bestimmten ein kleineres Molekulargewicht bei Casein als bei Hämoglobin.

2. Das ungewöhnlich hohe Ausmaß des Eiweißzerfalls im Rahmen der ersten Dialysenserie (Campher), welches das der zweiten Serie (Toluol) bedeutend übertrifft, scheint in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Antiseptikums zu stehen, worauf schon einleitend bei der Beurteilung der Versuche *Plattners* und *Fischenich-Polanyis* hingewiesen wurde. Zerfallserscheinungen dürfen daher nur im Rahmen der zweiten Dialysenserie mit genügender Sicherheit auf (nicht bakterielle) autolytische Zersetzung bezogen werden.

3. Die Feststellung eines ausgeprägten Natriumübertritts bei fehlendem oder geringem Stickstoffdurchtritt und gleichzeitiger Eiweißtrübung im Dialysat erbringt den sicheren experimentellen Nachweis membranhydrolytischer Vorgänge. Das übergetretene Natrium kann sich jedoch nicht in seiner Gesamtheit als Hydroxyd in der Außenflüssigkeit befinden, da die Größenordnung seiner Konzentration in keinem Verhältnis zu der um vieles geringeren Hydroxylionenkonzentration der Außenflüssigkeit steht; es muß also ein Teil des Natriums ein anderes Gegenion besitzen als welches vor allem Stickstoffkörper und HCO_3, möglicherweise aber auch PO_4''' (bzw. H_2PO_4', HPO_4'') (aus

abgespaltenem Caseinphosphor) in Betracht gezogen werden können. Eine Entscheidung dieser Frage soll nach Erörterung des Verhaltens der Leitfähigkeiten versucht werden.

4. Die Beurteilung des Verhältnisses der Leitfähigkeiten wurde in gleicher Weise wie in Tabelle II durch Reduktion auf das Ausgangsvolumen durchgeführt.

Tabelle IIId.

Nr.	Reduzierte $K = 10^{-4}$		Gesamt-K $= 10^{-4}$	Gesamt-K in Proz. der Ausgangs-K
	innen	außen		
I	4,05	2,80	6,85	138
II	6,58	5,51	12,09	243
III	7,56	5,91	13,47	271
IV	5,84	9,67	15,51	311
V	5,02	14,81	19,83	398
VI	4,03	1,72	5,75	108
VII	2,45	2,73	5,18	101
VIII	1,79	3,33	5,12	99
IX	1,31	3,96	5,27	102
X	1,36	3,49	4,85	94
XI	4,15	2,08	6,23	107
XII	3,78	2,10	5,88	99

Als Ergebnis dieser Betrachtung darf also verzeichnet werden, daß in den Campherdialysen der ersten Serie, in deren Verlauf mehr oder weniger ausgeprägter Stickstoffzerfall offenkundig wurde, wie in den Versuchen *Plattners*, eine sehr bedeutende Zunahme des Gesamtleitvermögens auftrat, die in der Dialyse V, bei welcher fast alles Eiweiß in nicht koagulable Stickstoffkörper übergeführt wurde, das Vierfache des Ausgangsleitvermögens erreichte. In den Toluoldialysen der zweiten Serie hingegen blieb eine Zunahme des Gesamtleitvermögens aus oder erreichte nur eine geringe Größe von maximal 108 Proz.

Dieser Befund muß insofern besondere Beachtung erfahren, als bei einfacher Verdünnung neutraler Alkalicaseinate eine relative Zunahme des Leitvermögens beobachtet wurde.

Pauli und *Matula* (l. c.) bestimmten ihr Ausmaß in Bestätigung und Erweiterung einer ursprünglich von *Laqueur* und *Sackur* (l. c.) durchgeführten Messungsreihe mit 10 Proz. bei zweifacher, 23 Proz. bei vierfacher, 36 Proz. bei achtfacher Verdünnung[1]), *Fischenich* und *Polanyi* (l. c.) gaben sogar eine Erhöhung von 65 Proz. bei zehnfacher Verdünnung an.

[1]) Es wurde ein 0,025 n Natriumcaseinat bei einem Caseingehalt von 2,84 g-Proz. (also $V = 40$) bis $V = 640$ verdünnt; für die obige Berechnung wurde als Ausgangslösung die erste Verdünnung ($V = 80$) in Betracht gezogen, deren Normalität $n = 0{,}0125$, Caseinkonzentration $= 1{,}42$ g-Proz. und spezifische Leitfähigkeit $k = 6{,}41 \cdot 10^{-4}$ am ehesten mit den hier verwendeten Caseinatlösungen verglichen werden konnte; das reduzierte Leitvermögen stieg bei zwei-, vier-, achtfacher Verdünnung auf $k = 7{,}02 — 7{,}88 — 8{,}72 \cdot 10^{-4}$ an.

Da in den eigenen Dialysen die Caseinatmenge zum Außenwasser in einem Verhältnis

von 1 : 2	. . . . in Dialyse	VI
„ 1 : 5	. . . . „ „	VII
„ 1 : 2,8	. . . . „ „	VIII
„ 1 : 2,5	. . . . „ „	IX, X
„ 1 : 3,3	. . . . „ „	XI, XII

stand, die Verdünnung also bei Annahme völligen Ausgleichs ein rund sechsfaches (VII), viereinhalbfaches (XI, XII), vierfaches (VIII), dreieinhalbfaches (IX, X) und dreifaches (VI) Ausmaß erreichte, wäre eine relative Erhöhung des reduzierten Leitvermögens von rund 30 Proz. (VII), 26 Proz. (XI, XII), 23 Proz. (VIII), 19 Proz. (IX, X) und 16 Proz. (VI) zu erwarten gewesen.

Daß diese Leitfähigkeitszunahme im Rahmen der Dialysen, also bei Anwesenheit einer trennenden Membran, ausblieb, muß offenbar auf deren Einflußnahme im Sinne einer Verhinderung des bei gewöhnlicher Verdünnung eintretenden völligen Ausgleichs bezogen werden.

5. Die Entscheidung der unter 4. aufgeworfenen Frage über die Art des Gegenions des diffundierten Natriums, soweit die Leitfähigkeit nicht durch OH' gedeckt wird, darf auf Grund folgender experimenteller Betrachtung versucht werden.

PO_4''' (bzw. H_2PO_4' und HPO_4'') darf ausgeschlossen werden, da die qualitative Prüfung auf dieses Anion in der Außenflüssigkeit von drei Dialysen, in denen wenig Stickstoffkörper die Membran passierten (VI, XI, XII), ein negatives Ergebnis aufwies.

Die Prüfung erfolgte in den (eiweißfreien und gekochten) Außenflüssigkeiten mittels der Chlorbarium- und Molybdänreaktion in der üblichen Weise; es trat weder ein weißer noch ein gelber Niederschlag auf.

Um über das quantitative Ausmaß einer Wechselwirkung zwischen dem Natrium der Außenflüssigkeit und der Luftkohlensäure Aufschluß zu erhalten, wurden folgende orientierende Untersuchungen durchgeführt:

Es wurden in drei Versuchen je 20 ccm n/100 NaOH durch Fischblasen sowie Pergamentmembranen gegen je 100 ccm Wasser in gleicher Weise wie in den Caseinatversuchen dialysiert. Bei Reduktion der innen und außen bestimmten Leitfähigkeitswerte auf das Ausgangsvolumen ergaben sich Abfälle des reduzierten Leitvermögens um 53,2, 52,9 und 52,7 Proz., entsprechend der geringeren Wanderungsgeschwindigkeit des HCO_3' ($v = 46{,}1$)[1]) gegenüber der des OH'.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse scheint die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung zwischen $Na^{\cdot}$ und HCO_3' auch in den Caseinat-

---

[1]) *Kendall*, Journ. of Amer. Chem. Soc. 1921.

versuchen gegeben, in welchen das diffundierte Na˙ der Außenflüssigkeit durch die vorhandenen OH′ und Stickstoffkörper nicht gedeckt werden können.

Der zur Beurteilung dieser Verhältnisse durchgeführte Vergleich der Natrium-Stickstoffrelation in der jeweiligen Caseinatausgangslösung einerseits, der Innen- und Außenflüssigkeit nach Abbruch der Dialyse andererseits ergibt folgende Mengen Stickstoffkörper auf 1 Grammäquivalent Natrium ($N_{(Cas)}$):

in Caseinat A . . . . 248,0 g
„ „ B . . . . 266,0 g
„ „ C . . . . 273,0 g

während in den Dialysenflüssigkeiten folgende Beziehungen herrschen.

Tabelle IIIe.

Auf 1 Grammäquivalent Natrium entfallende Stickstoffmenge (in g): in der Innenflüssigkeit = $N_{(i)}$, in der Außenflüssigkeit = $N_{(a)}$.

Nr.	$N_{(i)}$	$N_{(a)}$	$\frac{N_{(i)}}{N_{(Cas)}}$	$\frac{N_{(a)}}{N_{(Cas)}}$
VI	309,6	35,3	1,25	0,14
VII	306,0	211,6	1,15	0,80
VIII	367,9	212,4	1,39	0,80
IX	269,7	262,6	1,01	0,99
X	263,0	250,8	0,99	0,94
XI	373,1	9,7	1,37	0,035
XII	386,7	13,1	1,42	0,048

Die Betrachtung der Tabelle zeigt, daß in der Innenzelle aller Dialysen außer IX und X, in welchen extreme Membrandurchlässigkeit und Dialysendauer zu völligem Ausgleich zwischen Innen- und Außenflüssigkeit führten, eine ausgesprochene relative Zunahme des stickstoffhaltigen Anteils gegenüber dem Natriumanteil, in der Außenzelle hingegen in den gleichen Versuchen ein korrespondierendes relatives Absinken der Stickstoffkörper, bezogen auf das Äquivalent Natrium, in Erscheinung tritt. Während also das Natrium der Innenflüssigkeit einem Stickstoffkörperüberschuß gegenübersteht, bleibt ein mehr oder weniger großer Anteil des Natriums der Außenflüssigkeit ungedeckt und muß demgemäß einem anderen Gegenion zugeordnet werden.

Das Ausmaß dieses ungedeckten Natriumanteils, ausgedrückt in Prozenten des Gesamtnatriums der Außenflüssigkeit ergibt sich aus folgender Tabelle IIIf.

Tabelle IIIf.

Dialyse Nr	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Ungedecktes Natrium (a)	86	20	20	1	6	97	95

Auf Grund dieser Befunde darf also die Berechnung des spezifischen Leitvermögens der Innen- und Außenflüssigkeit in folgender Weise zur Durchführung kommen:

Als Gegenion wird in der Innenzelle der Dialysen VI, VII, VIII, XI, XII, in welchen die Lösung des Natriums im Stickstoffkörperüberschuß erfolgt (Caseinat)‴ (Casein), mit der Wanderungsgeschwindigkeit $v = 28$ (dem entsprechenden, von *Pauli* angegebenen Wert), in den Dialysen IX, X, in welchen die gleiche Natrium-Stickstoffkörperrelation wie im Ausgangscaseinat aufrechterhalten bleibt (Caseinat)‴, mit der Wanderungsgeschwindigkeit $v = 30$ (*Pauli*) eingesetzt; in der Außenzelle hingegen wird HCO_3' mit der Wanderungsgeschwindigkeit $v = 46,1$ in jenem Ausmaß in Rechnung gestellt, welches aus dem Defizit der Stickstoffkörper sich ergibt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der N-Körper wird mit $v = 30$ eingesetzt, da angenommen werden darf, daß die entsprechenden Werte des Caseinats und seiner hochmolekularen Spaltprodukte wenig voneinander abweichen. Die Berücksichtigung der OH' darf entfallen, da die Größenordnung ihrer Konzentration zu klein ist, um das Rechnungsergebnis zu beeinflussen.

Die solcherweise berechneten spezifischen Leitfähigkeiten der Innen- ($k_{i\,ber.}$) und Außenflüssigkeit ($k_{a\,ber.}$) und ihr Verhalten zu den gefundenen Leitfähigkeiten ($k_{i\,gfd.}$, $k_{a\,gfd.}$) sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle IIIg.

Nr.	Normalität des Natriums (i)	$K_{(i)}$ ber. 10^{-4}	$\frac{K_{(i)}\text{ gef.}}{K_{(i)}\text{ ber.}}$	Normalität des Natriums (a)	$K_{(a)}$ ber. 10^{-4}	$\frac{K_{(a)}\text{ gef.}}{K_{(a)}\text{ ber.}}$
VI	0,0074	5,77	0,69	0,0013	1,22	0,71
VII	0,0031	2,42	0,56	0,0010	0,83	0,78
VIII	0,0039	3,04	0,59	0,0023	1,92	0,63
IX	0,0043	3,44	0,51	0,0024	1,92	0,75
X	0,0045	3,60	0,49	0,0025	2,02	0,63
XI	0,0067	5,21	0,74	0,00083	0,80	0,80
XII	0,0069	5,38	0,70	0,00093	0,90	0,70

Das Verhältnis $k_{gfd.}/k_{ber.}$ kann als mittlerer Leitfähigkeitskoeffizient (im Sinne der klassischen Dissoziationstheorie als mittlerer Dissoziationsgrad) der Natriumsalze der Innen- bzw. Außenflüssigkeit bezeichnet werden. Es ist nun ersichtlich, daß diese mittleren Leitfähigkeitskoeffizienten in der Innenflüssigkeit kleinere Größen (0,49 bis 0,74) darstellen, wie in der Außenflüssigkeit (0,63 bis 0,80), daß also der Caseinüberschuß in der Innenzelle eine stärkere Inaktivierung von $Na^{\cdot}$ nach sich zieht. Wohl sind auch in der Außenflüssigkeit die mittleren Leitfähigkeitskoeffizienten nicht so groß, wie man bei Natriumsalzlösungen solcher Konzentration im allgemeinen beobachtet, doch

können sie in Anbetracht der unvermeidbaren Unsicherheit, die der zugrundeliegenden Berechnungsweise anhaftet, als durchaus plausibel für eine einfache Auffassung des physiko-chemischen Verhaltens von Alkalicaseinaten angesehen werden.

Zusammenfassend darf also gesagt werden:

1. Entsprechend hergestellte und unter Toluol bei Zimmertemperatur aufbewahrte neutrale Natriumcaseinate erfahren innerhalb mehrmonatiger Beobachtungszeit keine Änderung ihres Leitvermögens und keine autolytische Zersetzung, wie sich am Ausbleiben inkoagulabler Stickstoffkörper erkennen läßt. Die Beurteilung des autochthonen Leitvermögens neutraler Alkalicaseinate und der Ergebnisse aller darauf beruhender Folgeuntersuchungen wird durch das Vorkommen sekundärer, durch verschiedene (z. B. membrandialytische) Einflußnahme bewirkter Zerfallsvorgänge nicht berührt.

2. Bei Membrandialyse neutraler Natriumcaseinate kommt es hingegen trotz sicherer Vermeidung bakterieller Zersetzung zu geringem, autolytischem Zerfall des Caseins, kenntlich am Auftreten nichtkoagulabler Stickstoffkörper. Eine Erhöhung des Gesamtleitvermögens tritt dabei nicht oder nur in geringem Ausmaß in Erscheinung. Der Vorgang kommt in der Weise zur Beobachtung, daß neben mehr oder weniger bedeutendem Übertritt inkoagulabler (und auch koagulabler) N-Körper, deren Ausmaß von Membrandichte und Dialysendauer bestimmt wird, bei geringer Vermehrung der OH'-Konzentration in der Außenflüssigkeit bedeutende Natriummengen nachgewiesen werden können, während in der Innenzelle unter Verminderung der OH'-Konzentration Eiweißtrübungen (zumeist) stabiler Natur auftreten. Da das Natrium der Außenflüssigkeit durch OH' nur zu verschwindendem Anteil kompensiert wird, müssen als Gegenionen zunächst diffundierte N-Körper, im Falle nicht genügender Anwesenheit derselben aber HCO_3' in Betracht gezogen werden; phosphorhaltige Gegenionen können ausgeschlossen werden. Die auf solcher Grundlage berechnete Inaktivierung des Natriums der Außenflüssigkeit beträgt im Mittel 28,6 Proz.

Bei nicht sicherer Vermeidung bakterieller Zersetzung erreicht der Caseinzerfall ein sehr großes Ausmaß unter gleichzeitiger Vermehrung des Leitvermögens auf ein Vielfaches des Ausgangswertes.

Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und Ionendurchlässigkeit von Membranen.

VIII. Mitteilung:

Die Permeabilität der getrockneten Kollodiummembran für Nichtelektrolyte.

Von

Akiji Fujita.

(Aus dem biochemischen Institut der Aichi-Medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 12. November 1925.)

In der Membran aus völlig ausgetrocknetem Kollodium hatten wir ein Objekt kennengelernt, welches wegen der Analogie seiner Permeabilität mit gewissen physiologischen Membranen besonders interessant ist. Die Permeabilität an dieser Membran wurde bisher systematisch nur für Elektrolyte untersucht[1]). Es zeigte sich, daß die Membran für beliebige Anionen impermeabel, aber für eine Reihe von Kationen, nämlich für einwertige Kationen permeabel ist, daß die Reihenfolge der Permeabilität der verschiedenen einwertigen Kationen qualitativ zwar dieselbe ist wie die Reihenfolge der Beweglichkeit im Wasser, aber die Unterschiede außerordentlich viel größer als im Wasser sind. In der jetzigen Arbeit soll untersucht werden, wie die ausgetrocknete Kollodiumhülse sich gegen Nichtelektrolyte verhält.

Die Methode bestand in der Messung der Diffusionsgeschwindigkeit einer m/10 Lösung der verschiedenen Stoffe gegen reines Wasser, welches durch eine solche Membran von der Lösung getrennt war. Zunächst wurden qualitative Versuche angestellt, indem von Tag zu Tag an einer Probe des Wassers der Durchtritt der Substanz geprüft wurde. Bei der Untersuchung flüchtiger Substanzen wurde die Kollodiumhülse durch einen mit Paraffin getränkten Korkpfropfen verschlossen, der mit einem Baumwollfaden befestigt wurde, der Verschluß

---

[1]) *L. Michaelis* und *A. Fujita*, diese Zeitschr. **161**, 47, 1925 und **164**, 23, 1925.

nochmals mit Paraffin gedichtet und das Ganze in ein luftdicht verschlossenes Gefäß, welches die andere Lösung enthielt, eingesetzt. Die Dicke der Hülsen kann durchschnittlich auf etwa 0,1 mm oder etwas kleiner veranschlagt werden. Auf diese Weise ergab sich, daß schon nach einem Tage der Durchtritt deutlich nachweisbar war bei Aceton, Methylalkohol, Äthylalkohol, Propylalkohol, Butylalkohol, Allylalkohol, Formaldehyd, Formamid, Anilin, Chloroform, erst nach mehreren Tagen bei Chloralhydrat, Methylurethan, Äthylurethan, Acetamid, Äthylenglykol, Monochlorhydrin, Amylalkohol, Octylalkohol, Heptylalkohol, Phenol, Tributyrin, Glykokoll, Glycerin, Monoacetin, gar kein Durchtritt wurde beobachtet bei Mannit, Traubenzucker, Fruchtzucker, Rohrzucker. Diese Substanzen bilden eine Auswahl genügend verschiedener Typen und sind zum großen Teil dieselben, welche *Collander*[1]) bei seinen Diffusionsversuchen mit der Ferrocyankupfermembran angewendet hat. Alle diese Substanzen wurden, soweit sie genügend löslich waren, in m/10 Lösung, anderenfalls in gesättigter Lösung angewendet. Der Nachweis der verschiedenen Alkohole, Säureamide, Äthylenglykol, Monoacetin, Monochlorhydrin, Chloroform, Chloralhydrat, Mannit, Formaldehyd geschah durch Reduktion von Chromsäure, bei den höheren schwer löslichen Alkoholen und Tributyrin stalagmometrisch, bei Phenol durch Bromwasser, bei Anilin durch die Isonitrilreaktion, bei Glykokoll durch Stickstoffbestimmung, bei den Zuckern mit den üblichen Reagenzien. Um diese Versuche einigermaßen quantitativ zu gestalten, wurde folgendes Verfahren angewendet. In das äußere Wasser wurde eine der leicht durchgängigen Substanzen, 0,1 Mol pro Liter, als Vergleichssubstanz, und gleichzeitig eine zweite Substanz, ebenfalls ungefähr 0,1 Mol pro Liter, gebracht und nach geeigneter Zeit in der Innenflüssigkeit die Vergleichssubstanz und die andere quantitativ bestimmt. Während der Diffusion ist die Kollodiumhülse, wie erwähnt, mit paraffiniertem Korkpropfen gut verschlossen und das Ganze in luftdicht verschlossenem Gefäß aufbewahrt. In den meisten Fällen waren nach Beendigung des Versuchs weniger als 10 Proz. der Substanz herausdiffundiert. Daher war die treibende Kraft der Diffusion, der Unterschied des osmotischen Partialdrucks der Substanz in beiden Flüssigkeiten, praktisch während der Versuchsdauer konstant, und das Verhältnis der durchgetretenen Mengen der beiden Stoffe konnte daher als das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten innerhalb der Membran betrachtet werden. Als Vergleichssubstanz wurde in allen Versuchen Harnstoff verwendet. Dabei wurden folgende Bestimmungsmethoden verwendet. Harnstoff wurde bestimmt durch das Mikrokjeldahlverfahren nach *Bang*, Aceton jodometrisch, und die

---

[1]) *R. Collander*, Kolloidchem. Beihefte 19, 72, 1924.

anderen Substanzen wurden durch die Chromsäuremethode bestimmt, welche von *Bang*[1]) zur Mikrofettbestimmung ausgearbeitet worden ist. Die Methode wurde für jede Substanzart vorher empirisch geeicht. Es ergab sich, daß innerhalb der für unsere Analyse in Betracht kommenden Mengenverhältnisse die verbrauchte Menge der Chromsäure der Substanzmenge ziemlich genau proportional war und die Gegenwart von Harnstoff nicht störend wirkte, so daß die Methode für unsere Zwecke hinreichend genau ist. Die Tabelle I zeigt Beispiele der Eichungsanalysenzahlen. Zur Berechnung der diffundierten Substanzmenge wurde folgendermaßen verfahren. Nach Beendigung des Versuchs wurde zunächst eine andere Probe derjenigen Lösung, welche als Außenlösung benutzt worden war, nach zehnfacher Verdünnung mit Wasser in zwei bis drei Parallelversuchen, in der Regel in einer Menge von 1 bzw. 2 bzw. 5 ccm, analysiert, sodann entsprechende Analysen mit

Tabelle I.

m/100 Harnstoff + ungefähr m/100 *X*.

X	Gebrauchte *X*-Menge ccm	Verbrauchte n/10 Chromsäuremenge (korrigiert) ccm	Pro ccm *X* verbrauchte Chromsäuremenge ccm	Mittel
Harnstoff ohne Zusatz	1	0	0	0
	2	0	0	
Methylalkohol . . .	1	0,544	0,544	0,535
	2	1,036	0,518	
	5	2,710	0,542	
Äthylalkohol	2	0,658	0,329	0,342
	5	1,784	0,356	
Propylalkohol . . .	1	0,544	0,544	0,539
	2	1,110	0,555	
	5	2,600	0,520	
Butylalkohol	1	0,920	0,920	0,911
	2	1,852	0,926	
	5	4,430	0,886	
Formamid	1	0,179	0,179	0.186
	2	0,400	0,200	
	5	0,906	0,181	
Monoacetin	1	1,122	1,122	1,050
	2	2,053	1,026	
	5	5,022	1,004	
Äthylenglykol . . .	1	1,043	1,043	1,014
	2	1,970	0,985	
Chloralhydrat . . .	1	0,179	0,179	0,184
	2	0,395	0,197	
	5	0,880	0,176	

[1]) *I. Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. 5. Aufl., S. 38. München und Wiesbaden, Bergmann, 1922.

der Innenlösung im unverdünnten Zustande gemacht. Durch Vergleich der Analysenzahlen wurde der Grad der Diffusion beider Substanzen relativ zueinander berechnet.

Bei der Bestimmung von Formamid wurde zunächst die gesamte Stickstoffmenge bestimmt, dann die Formamidmenge durch Chromsäure bestimmt und durch Subtraktion hieraus die Harnstoffkonzentration berechnet. Die Versuche ergaben folgendes (Tabelle II).

Tabelle II.

Diffusionsversuch mit getrockneter Kollodiumhülse. Außenlösung: m/10 Harnstoff + m/10 X. In den Eisschrank gelegt. Die einzelnen Zahlen sind die Resultate mit verschiedenen Hülsen.

X	Diffusionsdauer in Tagen	Konzentration des Harnstoffs in Millimol pro Liter	Konzentration von X in Millimol pro Liter	Diffusionsverhältnis $X : U^+$	Mittel
Methylalkohol	16	4,08	37,20	9,10	9,243
		4,81	46,60	9,70	
		4,31	38,40	8,93	
Aceton	7	2,84	20,70	7,30	7,080
		1,69	12,20	7,22	
		2,34	15,70	6,72	
Formamid . .	16	7,15	35,20	4,92	4,111
		12,90	42,30	3,28	
		9,50	39,20	4,13	
Äthylalkohol .	16	5,31	15,50	2,72	2,982
		3,12	8,41	2,70	
		5,04	13,38	2,65	
		6,85	23,60	3,44	
		5,38	18,30	3,40	
Propylalkohol	7	3,13	4,01	1,28	1,033
		5,61	5,26	0,94	
		3,24	2,87	0,88	
Butylalkohol .	13	4,85	4,02	0,83	0,825
		9,08	7,46	0,82	
Äthylenglykol	26	5,27	1,85	0,35	0,270
		8,27	2,22	0,27	
		9,55	1,79	0,19	
Glycerin . . .	28	11,20	2,98	0,27	0,220
		19,40	3,33	0,17	
		10,78	2,37	0,22	
Chloralhydrat .	27	3,98	0,43	0,11	0,107
		10,30	1,14	0,11	
		10,00	0,97	0,10	
Monoacetin . .	26	3,02	0,23	0,076	0,078
		3,06	0,23	0,075	
		4,40	0,32	0,082	
α-Monochlorhydrin . . .	14	2,39	0,16	0,068	0,067
		19,60	1,26	0,064	
		19,40	1,35	0,069	

An dieser Tabelle ist auffällig, in wie weitem Maße die Diffusionskoeffizienten der verschiedenen Substanzen sich unterscheiden. Man gewinnt sofort den Eindruck, daß dieselbe Erscheinung vorliegt, wie für die durchgängigen Kationen nach unseren früheren Mitteilungen[1]). Die Reihenfolge der Durchgängigkeit war dieselbe wie die Reihenfolge der Diffusion im Wasser, aber die Unterschiede waren außerordentlich verstärkt. Ähnlich scheint es jetzt bei den Nichtelektrolyten zu sein. Um dies mit Sicherheit aussagen zu können, wäre es wünschenswert, die Diffusionskoeffizienten dieser Substanzen für wässerige Lösungen zu kennen. In der Literatur liegt nur für einen ziemlich kleinen Teil dieser Substanzen eine Angabe des Diffusionskoeffizienten vor. Wir mußten deshalb diese Zahlen selbst bestimmen. Die exakte Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten gehört zu den schwierigsten Aufgaben, aber für unsere Zwecke genügen Näherungswerte. Außerdem brauchen wir nur den relativen Wert im Verhältnis zu irgend einer Vergleichssubstanz. Wir wendeten zur Bestimmung der relativen Diffusionskoeffizienten folgendes Verfahren an: Wenn man die Diffusion durch eine auf gewöhnliche Weise, also nicht ausgetrocknete Kollodiummembran stattfinden läßt, so ist zu erwarten, daß die relativen Diffusionskoeffizienten in der Membran kaum anders sind als in reinem Wasser. Für die Diffusion von Elektrolyten können wir das leicht beweisen. Wir hatten früher beschrieben[1]), daß bei der Diffusion z. B. von n/10 KCl und n/100 KCl in durchaus getrocknetem Kollodium eine P. D. von beinahe 57 Millivolt entsteht, und daß in direkten Diffusionsversuchen eine Diffusion von KCl überhaupt nicht nachweisbar ist. Dies war das Zeichen dafür, daß der Diffusionskoeffizient des Cl-Ions und des K-Ions, welche im Wasser einander praktisch gleich sind, sich in der Hülse bis zu einem Verhältnis von beinahe $1 : \infty$ verschoben hatte. Bei Anwendung einer Pergamentmembran verschob sich das Verhältnis[2]) nur etwa auf 1 : 1,6, und bei einer gewöhnlichen, nicht getrockneten Kollodiummembran war, wie wir früher berichteten, die P. D. noch sehr viel geringer als beim Pergament, meist nur 2 bis 5 Millivolt, woraus eine nur sehr unbedeutende Änderung des relativen Diffusionsvermögens des $K^{\cdot}$ und des Cl' durch die Membran folgt. Daraus ergibt sich, daß die Diffusionskoeffizienten der verschiedenen Substanzen in der leicht durchlässigen, offenbar sehr grobporigen Membran so gut wie gar nicht geändert werden, wenn die Substanzen nicht geradezu kolloid sind. Wir können daher den mit einer durchlässigen Kollodiummembran bestimmten Diffusionskoeffizienten als praktisch

---

[1]) *L. Michaelis* und *A. Fujita*, l. c.

[2]) *A. Fujita*, l. c. Über die Berechnung siehe *L. Michaelis*, Journ. of gen. Physiol. 8, 33, 1925.

gleich dem für Wasser gültigen Koeffizienten betrachten, und in der Tat zeigte sich in unseren Versuchen, daß für diejenigen Substanzen, von denen in der Literatur ein Diffusionskoeffizient angegeben ist, die mit der durchlässigen Kollodiummembran bestimmten relativen Diffusionskoeffizienten praktisch mit den anderen übereinstimmen, soweit die nicht sehr gut übereinstimmenden Zahlen aus der Literatur dies auszusagen gestatten. Danach gestaltet sich die Methode folgendermaßen:

Eine Lösung, welche 0,1 Mol KCl pro Liter als Vergleichssubstanz und die zu untersuchende Substanz in angenähert derselben Konzentration enthielt, wurde in ein Becherglas eingefüllt und in dieses eine gewöhnliche, leicht durchlässige Kollodiummembran mit reinem Wasser eingetaucht, eine geeignete Zeit lang, in der Regel 3 Minuten, unter leichter schüttelnder Bewegung gehalten, dann herausgenommen und der Inhalt der Hülse quantitativ auf Chlor und die zweite Substanz untersucht. Die Diffusionszeit wurde immer nur so lange ausgedehnt, daß höchstens 10 Proz. (gelegentlich bis 12 Proz.) der Substanzen durchgetreten waren, das osmotische Diffusionsgefälle konnte also während der Versuchszeit als annähernd konstant angesehen werden, und das Verhältnis der gefundenen Menge Chlor und der anderen Substanz kann als Annäherungsmaß für die relativen Diffusionskoeffizienten der beiden Substanzen betrachtet werden, wobei der Koeffizient des KCl als Einheit dient. Auf diese Weise ergaben sich folgende Zahlen (Tabelle III).

Betrachten wir die Diffusionskoeffizienten für die leicht durchlässige Kollodiummembran, die wir praktisch wohl gleich denen der freien Diffusionskoeffizienten setzen können, so spiegelt sich darin ungefähr das aus der Literatur[1]) bekannte Tatsachenmaterial wieder. Die Übereinstimmung dieser Koeffizienten bei den verschiedenen Autoren und verschiedenen Methoden ist meist nicht gut, und meist zeigt sich auch ziemlich bedeutende Abhängigkeit des Koeffizienten von der Konzentration, aber das allgemeine Bild wird doch richtig wiedergegeben. Der Umstand, daß der Diffusionskoeffizient der einen Substanz durch die Gegenwart der Vergleichssubstanz etwas verändert werden könnte, dürfte keinen größeren Fehler verursachen als die übrigen Unsicherheiten der Methode.

Die Größe der Koeffizienten schwankt zwischen dem am leichtesten und dem am schwersten diffusiblen Stoff unserer Versuchsreihe (Methylalkohol und Traubenzucker) nur zwischen 1 und 0,44. Vergleichen wir

---

[1]) *Landolt-Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen, 5. Aufl., 1, 68. Berlin 1923.

Tabelle III.

Diffusionsversuch mit gewöhnlicher Kollodiumhülse.
Außenlösung: m/10 KCl + m/10 X, Temperatur 21 bis 23° C.
Diffusionsdauer 3 bis 4 Minuten.

X	Konzentration d. Chlors in Millimol pro Liter	Konzentration von X in Millimol pro Liter	Diffusionsverhältnis X:KCl	Mittel	Aus der Literatur bekannte Diffusionskoeffizienten *)
Methylalkohol	9,35	9,72	1,04	1,000	
	8,85	8,50	0,96		
Aceton	7,90	7,37	0,93	0,910	
	8,40	7,50	0,89		
Formamid . .	11,00	9,60	0,87	0,865	
	10,00	8,60	0,86		
Äthylalkohol .	7,15	6,56	0,92	0,935	(0,25 Proz., 18° C) 1,11 (*Thovert*)
	9,03	8,60	0,95		
Propylalkohol	11,60	9,25	0,80	0,815	[Amylalkohol] (0,25 Proz., 18° C) 0,88 (*Thovert*)
	12,10	10,10	0,83		
Harnstoff . .	6,47	5,52	0,85	0,815	(0,875 Proz., 14,8° C) 0,926 (*Heimbrodt*)
	5,60	4,40	0,78		
Butylalkohol .	10,85	7,35	0,68	0,690	
	7,53	5,27	0,70		
Äthylenglykol	9,10	0,60	0,66	0,655	
	9,35	0,61	0,65		
Glycerin . . .	10,50	6,90	0,66	0,660	(0,875 Proz., 10° C) 0,342 (*Heimbrodt*) (0,25 Proz., 18° C) 0,79 (*Thovert*)
	11,60	7,70	0,66		
Chloralhydrat	8,35	5,60	0,67	0,665	(12°) 0,59 (*Euler*)
	7,15	4,70	0,66		
α-Monochlorhydrin	10,35	5,98	0,58	0,575	
	10,60	6,05	0,57		
Traubenzucker	13,50	5,74	0,42	0,440	[Arabinose] (0,5 Proz., 9,4° C) 0,365 (*Öholm*) [Lactose] (0,25 Proz., 18° C) 0,41 (*Thovert*) [Maltose] (0,25 Proz., 19,6° C) 0,348 (*Öholm*) (0,25 Proz., 18° C) 0,41 (*Thovert*) [KCl] (0,9 Proz., 17,5° C) 1,52 (*Thovert*) (1,0 Proz., 6° C) 0,955 (*Öholm*)
	14,30	6,62	0,46		

*) Entnommen aus den Tabellen von *Landolt-Börnstein*; die Zahlen sind die Absolutwerte der Diffusionskoeffizienten. Mit Hilfe der ganz unten in dieser Spalte angegebenen Absolutwerte für KCl kann der Relativwert für jede Substanz berechnet werden, wenn man die Zahlen des gleichen Autors benutzt.

die Glieder einer homologen Reihe, so fällt z. B. der Koeffizient bei den einwertigen Alkoholen mit der Verlängerung der Kohlenstoffkette. Es ergibt sich:

Methylalkohol	1,000
Äthylalkohol	0,935
Propylalkohol	0,815
Butylalkohol	0,690

Eine Anlagerung von Hydroxylgruppen verkleinert den Diffusionskoeffizient bedeutend, z. B.

Propylalkohol	0,815
Glycerin	0,660

Es ist nun nicht die Aufgabe dieser Arbeit, sich mit der Theorie der freien Diffusionskoeffizienten genauer zu beschäftigen, sondern nur seine Veränderung durch die getrocknete Kollodiummembran zu zeigen. Hierbei sind nun zwei Tatsachen ganz auffällig. 1. Die Reihenfolge, in der sich die verschiedenen Stoffe nach ihrem Diffusionskoeffizienten für die getrocknete Kollodiummembran ordnen, ist beinahe dieselbe wie für die freie Diffusion. Einige kleine Abweichungen von dieser Regel liegen vielleicht innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung des freien Diffusionskoeffizienten, z. B. das Verhalten von Formamid zu Äthylalkohol. Auffällige Unstimmigkeiten sind nirgends vorhanden. 2. Dagegen sind die Unterschiede der einzelnen Diffusionskoeffizienten bei der getrockneten Kollodiummembran bedeutend vergrößert. Wo der freie Diffusionskoeffizient (bezogen auf KCl als Einheit) kleiner als 0,5 wird, findet eine Diffusion durch getrocknetes Kollodium überhaupt nicht mehr statt. Unter denjenigen Stoffen, bei denen der Koeffizient für getrocknetes Kollodium überhaupt noch gut meßbar ist (von Methylalkohol bis Monochlorhydrin), verhält sich der Koeffizient der freien Diffusion im höchsten Falle wie 1 : 0,575, für das getrocknete Kollodium wie 9,24 : 0,067 = 1 : 0,007 25. Sehr kleine Unterschiede des freien Diffusionskoeffizienten entsprechen großen Unterschieden für die getrocknete Kollodiummembran, z. B. bei den in der obigen Tabelle aufgezählten Alkoholen:

	Methylalkohol	Äthylalkohol	Propylalkohol	Butylalkohol
Freie Diffusion (relativ zu Methylalkohol)	1	0,935	0,815	0,690
Diffusion in getrocknetem Kollodium (relativ zu Methylalkohol)	1	0,323	0,112	0,0894

Dies ist derselbe Befund wie in den früheren Mitteilungen für die Beweglichkeit der Kationen. Die Reihenfolge ist dieselbe in beiden Fällen, aber die Unterschiede sind bedeutend verstärkt. Die ganzen Resultate der Diffusion bei der getrockneten und gewöhnlichen Kollodiummembran sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Relative Diffusionsgeschwindigkeit.

Art	Mol.-Gew.	Diffusionsgeschwindigkeit bei gewöhnlichem Kollodium: KCl = 1	gewöhnlichem Kollodium: umgerechnet für $U^+ = 1$	getrocknetem Kollodium $U^+ = 1$
Methylalkohol	32	1,000	1,22	9,24
Aceton	58	0,910	1,11	7,08
Formamid	45	0,865	1,06	4,11
Äthylalkohol	46	0,935	1,15	2,98
Propylalkohol	60	0,815	1,00	1,03
Harnstoff	60	0,815	1,00	1,00
Butylalkohol	74	0,690	0,85	0,82
Äthylenglykol	62	0,655	0,80	0,27
Glycerin	92	0,660	0,81	0,220
Chloralhydrat	165	0,665	0,81	0,107
Monoacetin	134	—	—	0,08
α-Monochlorhydrin	110	0,575	0,70	0,07
Traubenzucker	180	0,440	0,54	0
Fruchtzucker	180	—	—	0
Mannit	182	—	—	0
Rohrzucker	342	—	—	0

Von besonderem Interesse wäre noch die Untersuchung der Durchlässigkeit für die *schwachen* Elektrolyte. Einige Stichproben auf diesem Gebiet ergaben, daß die Behandlung dieses Problems besonders schwierig ist. Indem ich die ausführliche Untersuchung hierüber vorläufig verschiebe, möchte ich nur einige Anhaltspunkte geben. Essigsäure und Ammoniak erwiesen sich als so durchlässig, daß sie auf dieselbe Weise untersucht werden konnten, wie Nichtelektrolyte. Die Versuche ergaben folgendes (Tabelle V):

Tabelle V.

Diffusionsversuch mit schwachen Elektrolyten mit getrockneter Kollodiumhülse.

Außenlösung: m/10 Aceton + m/10 X, Temperatur 24 bis 26° C.

X	Diffusionsdauer in Tagen	Konzentration des Acetons in Millimol pro Liter	Konzentration von X in Millimol pro Liter	Diffusionsverhältnis X : Aceton	umgerechnet für $X : U^+$
Ammoniak	3	6,85	39,9	5,82	37,15
		9,28	43,3	4,67	
			im Mittel:	5,245	
Essigsäure	5	3,68	1,6	0,435	2,31
		3,12	0,7	0,224	
		4,08	1,3	0,318	
			im Mittel:	0,326	

Essigsäure zeigt also ein ganz normales Verhalten, sie hat einen ungefähr ebenso großen Diffusionskoeffizienten wie Äthylalkohol. In der früheren Mitteilung hatten wir dagegen nachgewiesen, daß das Acetation wie alle Anionen undurchgängig ist. Ammoniak zeigt nach dieser Methode einen ganz abnorm hohen Diffusionskoeffizienten. Es diffundiert bei weitem schneller als irgend eine andere Substanz. Im Gegensatz dazu ist nach der früheren Mitteilung der Diffusionskoeffizient des NH_4-Ions im Kollodium fast genau gleich dem des K-Ions, wie dasselbe auch bekanntlich für die freie Diffusion gilt. Man könnte den Verdacht aussprechen, daß Ammoniak das Kollodium korrodiert, die Poren der Membran erweitert und so im allgemeinen die Durchlässigkeit der Hülsen erhöht. Dieser Einwand wird dadurch widerlegt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit des als Vergleichssubstanz dem Ammoniak beigemischten Aceton durchaus von derselben Größenordnung ist, wie in den anderen Fällen. Wir können somit die leichte Durchgängigkeit des NH_3 nur vorläufig als Tatsache registrieren und den Gegensatz zum NH_4-Ion als besonders auffällig hervorheben. Die Amine, Monomethylamin und Monoäthylamin, gehen ebenfalls sehr leicht durch die Membran, aber bei ihnen ist die korrodierende Wirkung ganz auffällig, m/10 Lösung dieser Substanzen erzeugen in einem Tage schon sichtbare Defekte in den Hülsen. Sie greifen die Hülsen viel stärker an als Ammoniak. Ferner soll erwähnt werden, daß im Gegensatz zu Essigsäure die Durchgängigkeit für Milchsäure, Oxalsäure, Maleinsäure so gering ist, daß quantitative Bestimmungen bisher nicht geglückt sind, und bei Citronensäure, Weinsäure bisher überhaupt eine Durchlässigkeit nicht nachgewiesen werden konnte.

Zum Schluß muß auch noch die Durchlässigkeit des getrockneten Kollodiums für Wasser erörtert werden. Der Nachweis dieser Durchlässigkeit ist nicht leicht. In Diffusionsversuchen, wo etwa eine m/10 Lösung eines undiffundiblen Stoffes wie KCl oder Zucker durch die Membran von reinem Wasser getrennt ist, kann man den Durchtritt des Wassers unter der Wirkung des osmotischen Druckes nicht ohne weiteres erkennen. Offenbar ist die Durchlässigkeit für Wasser nur von derselben Größenordnung wie für andere kleinere Molekülarten, und um sie gut zu demonstrieren, bedarf man eines hohen osmotischen Druckes und eines Steigrohres, welches in bezug auf luftdichten Verschluß die höchsten Ansprüche stellt. Der Nachweis gelang in folgender Weise. An dem unteren Ende eines Glaszylinders mit verweitertem und plangeschliffenem Rande wurde eine frisch hergestellte, nur oberflächlich getrocknete, aber nicht mit Wasser in Berührung gebrachte, ziemlich dicke Kollodiumhaut mit Baumwollfaden angebunden und dann über einen Tag lang vollkommen ausgetrocknet. So entsteht eine stark gespannte, wohl kaum 0,1 mm dicke ausgetrocknete

Kollodiummembran. Die umbundene Stelle wurde mit *heißem* Paraffin abgedichtet. Die obere Öffnung des Zylinders wurde mit einem Gummipfropfen verschlossen, durch welchen vier Bohrungen gingen, zwei für gebogene Glasrohre, mit deren Hilfe später die Lösung eingefüllt wurde; eine dritte für ein fast kapillares Steigrohr und eine vierte für ein Thermometer. Alle Bohrungen und der Gummipfropfen wurden in ganz getrocknetem Zustande mit *heißem* Paraffin sorgfältig abgedichtet. Dann wurde eine 2,5 mol. Rohrzuckerlösung eingefüllt, die Einführungsrohre verschlossen und das Ganze in ein Gefäß mit destilliertem Wasser gestellt. In der ersten Zeit, etwa 1 bis 2 Tage lang, bemerkt man nur ein leichtes *Fallen* des Meniscus des Steigrohres infolge der elastischen Ausdehnung des Kollodiums, dann endlich steigt das Niveau langsam, und 1 bis 2 Tage später hat es das obere Niveau des etwa 20 cm langen Steigrohres überschritten, die Flüssigkeit beginnt überzuquellen. So langsam erfolgt der Durchtritt des Wassers unter der Wirkung dieses etwa 56 Atm. betragenden osmotischen Druckes. Jedenfalls ist damit prinzipiell die Durchlässigkeit für Wasser erwiesen. Eine ähnliche Membran, aber in Dicke einer Zellmembran von $< 1\ \mu$, würde schon ganz leicht durchlässig für Wasser erscheinen. In anderen Versuchen wurde die Kollodiumhülse etwa zur Hälfte mit der Zuckerlösung gefüllt, luftdicht mit paraffiniertem Korkpfropfen und durch Umbinden mit Baumwollfaden und Paraffindichtung verschlossen und in destilliertes Wasser getaucht. In der Tabelle V ist die Gewichtszunahme des

Tabelle VI.

Diffusionsversuch vom Wasser (bei Zimmertemperatur).
Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Tag.

	2,5 mol. Traubenzucker (33 Proz.)			2,5 mol. Rohrzucker		
	Hülse A	Hülse B	Hülse C	Hülse D (besonders dünne Membran!)	Hülse E	Hülse F (besonders dünne Membran!)
Gewicht in g vor dem Eintauchen	17,0767	28,1734	26,9178	32,2562	20,9502	17,3275
Gewichtszunahme in g nach 1 Tag	—	—	—	—	—	—
Weitere Gewichtszunahme nach 2 Tagen .	0,8585 (0,4292)	0,7842 (0,3921)	1,0869 (0,5434)	4,5738 (2,2869)	0,9660 (0,4830)	3,0841 (1,5420)
„ 3 Tagen .	geplatzt	0,1897	0,3123	1,2255	0,2874	0,8484
„ 4 „ .	—	—	—	—	—	—
„ 5 „ .	—	0,5295 (0,2647)	0,8505 (0,4252)	3,3384 (1,6692)	0,7148 (0,3574)	1,9055 (0,9527)
„ 6 „ .	—	0,2541	0,3474	2,4824	0,3178	0,8288
„ 7 „ .	—	0,2933	geplatzt	geplatzt	0,3398	0,8099

Kollodiumsackes mit Inhalt notiert, dieselbe beträgt bei einer 33proz. Traubenzuckerlösung pro Tag etwa 0,3 g, und bei einer besonders dünnen Hülse konnte bei 2,5 mol. Rohrzuckerlösung die Gewichtszunahme pro Tag bis auf 1,2 g gesteigert werden. Hiermit ist jedenfalls der Nachweis erbracht, daß die Hülse für Wasser durchlässig ist, der Größenordnung nach in keinem höheren Grade als für die anderen durchgängigen Substanzen. Es konnte keine Methode ausfindig gemacht werden, um das Wasser in bezug auf seine Durchgängigkeit mit irgend einer anderen durchgängigen Substanz wirklich quantitativ zu vergleichen.

Zusammenfassung.

Für die Durchlässigkeit des getrockneten Kollodiums für Nichtelektrolyte ergibt sich dieselbe Regel wie für die Durchlässigkeit der einwertigen Kationen: Ordnet man die Substanzen in eine Reihe nach absteigenden Diffusionskoeffizienten, so ist die Reihenfolge für die getrocknete Kollodiummembran die gleiche, wie für die freie Diffusion, aber die Unterschiede sind in hohem Grade verstärkt. Stoffe, deren freier Diffusionskoeffizient kleiner als die Hälfte des von KCl ist, diffundieren durch das getrocknete Kollodium überhaupt nicht mehr. Ammoniak hat im Gegensatz zum NH_4-Ion ein bisher unerklärlich großes Diffusionsvermögen durch die Membran. Die Durchgängigkeit der Membran für Wasser läßt sich qualitativ nachweisen, aber es gibt keine Methode, um sie quantitativ mit der Durchlässigkeit für andere Molekülarten zu vergleichen. Jedenfalls dürfte sie nicht von höherer Größenordnung sein als für andere, relativ leicht durchgängige Substanzen.

Die Winklersche Bestimmungsmethode für in Wasser gelösten elementaren Sauerstoff sowie ihre Anwendung bei Anwesenheit oxydierbarer Substanzen.

Von

Gustaf Alsterberg.

(Aus dem zoologischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 21. November 1925.)

Einleitung.

Bei meinen Untersuchungen über den respiratorischen Mechanismus und die Sinnesphysiologie der *Tubifiziden* (*Alsterberg*, 1922, 1924a) stieß ich öfters auf die Frage, in welchem Maße elementarer Sauerstoff bei gleichzeitigem Vorhandensein reduzierender Substanzen (besonders H_2S) in wässeriger Lösung existieren könnte. Daraus geht hervor, daß eine genaue O_2-Analyse unter den erwähnten komplizierten Bedingungen sehr schwierig ist. Es kann nämlich leicht vorkommen, daß man bei Anwendung der üblichen Bestimmungsmethoden in Gegenwart reduzierender Stoffe einen niedrigeren als den wirklichen Wert erhält. Überdies gibt es Substanzen, die in wässeriger Lösung häufig in bezug auf Oxydation und Reduktion ein labiles System darstellen, infolgedessen als Katalysatoren fungieren und somit bei Sauerstoffanalysen störend einwirken können. Ein derartiger Stoff ist die salpetrige Säure, deren Bedeutung in sauerstoffanalytischer Beziehung ich in einer früheren Abhandlung recht eingehend erörtert habe (*Alsterberg*, 1925). Zu dieser Gruppe gehören auch die Eisenverbindungen, deren Einwirkung im folgenden besprochen werden soll.

Es ist klar ersichtlich, daß die oben angedeuteten Fragen höchst bedeutungsvolle Tatsachen tangieren. Vom physiologischen und hydrographischen Gesichtspunkt aus spielt das Studium des im Wasser gelösten Sauerstoffs eine sehr wichtige Rolle. Auch in hygienischen Untersuchungen stellt es einen sehr wichtigen Faktor dar, wobei nicht nur die direkte Bestimmung, sondern auch das Studium der Sauerstoffzehrung von Bedeutung ist (*Spitta*, 1900; *Kisskalt*, 1906; *Brezina*, 1906, 1908; *Korschun*, 1907; *Pleissner*, 1910; *Purvis* und *Black*, 1914; *A. Müller*, 1920).

I. Die im allgemeinen angewandten sauerstoffanalytischen Methoden.

Ehe ich auf die speziellen Resultate meiner Untersuchungen näher eingehe, möchte ich eine allgemeine Darstellung der verschiedenen Bestimmungsmethoden vorausschicken, die eine größere Rolle spielen oder spielten.

A. Gasometrische Methoden.

Das älteste Verfahren zur Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffs ist die von *Bunsen* (1857) ausgearbeitete gasometrische Methode, die noch heute bis zu einem gewissen Grade die Rolle einer Standardmethode spielt, wenn es sich darum handelt, den Geltungsbereich anderer einfacher Methoden zu bestimmen. Doch ist dieses *Bunsen*sche Verfahren zu kompliziert und zeitraubend und stellt auch zu große Anforderungen an die Apparatur, als daß es z. B. bei hydrobiologischen Untersuchungen angewandt werden könnte, bei denen die Ausführung der Analyse öfters direkt am Untersuchungsort erfolgen muß.

Man versuchte, diese Methode allerdings zu vereinfachen. So sollte der von *C. G. Müller* (1899) konstruierte „Tenax"-Apparat allen denjenigen Ansprüchen genügen, welche die ursprüngliche *Bunsen*sche Methode nicht erfüllen. Spätere Untersuchungen (*Korschun*, 1907; *Birge* und *Juday*, 1911) ergaben indessen wieder die Unbrauchbarkeit dieser modifizierten Methode. *Birge* und *Juday* arbeiteten, von der *Bunsen*schen Bestimmung ausgehend, eine Modifikation aus, die sich besser für die Untersuchung an Ort und Stelle eignen sollte, erklären aber gleichzeitig, daß diese abgeänderte Methodik doch noch zu viel Zeit erfordere, um die Ausführung einer großen Anzahl von Analysen pro Tag zu gestatten.

B. Bestimmungsmethoden nach Schützenberger, Gérardin und Risler.

Das Prinzip des von *Schützenberger*, *Gérardin* und *Risler* (1872, 1873) ausgearbeiteten Verfahrens besteht darin, daß dem Wasser, dessen Sauerstoffgehalt bestimmt werden soll, Indigoweiß zugesetzt wird, das vom vorhandenen Sauerstoff zu Indigoblau oxydiert wird. Dieses wird vermittelst einer Hydrosulfitlösung von bekanntem Gehalt zu Indigoweiß zurücktitriert. Die Grundlage dieser Methode ist also die Anwendung stark oxydierbarer und infolgedessen sehr empfindlicher Substanzen. Bei der Titration muß der atmosphärische Sauerstoff in der Weise entfernt werden, daß man durch die Apparatur sauerstofffreies Leuchtgas durchleitet. Die Methode ist also äußerst umständlich und die erreichten Resultate höchst strittig. Während einige Forscher gute Resultate erzielten, gelangten andere zu vollständig negativen Ergebnissen. *Chlopin* (1898) sucht, auf sehr eingehende Kontrolluntersuchungen sich stützend, diese Unsicherheit dadurch zu erklären, daß man nur bei mittelhohen O_2-Gehalten Werte, die sich mit den mit Hilfe anderer Methoden erreichten Ergebnissen vergleichen lassen, erhält, bei niedrigem O_2-Gehalt dagegen zu hohe und bei hohem zu niedrige Werte. Da besonders der Titer der Hydrosulfitlösung so unbeständig ist, daß „der Titer sich schon in der Bürette während des Titrierens ändert", glaubt *Chlopin* — und sicherlich mit vollem Recht —, folgendes sagen zu können: „Die Beobachtung aller angeführten Bedingungen, die Notwendigkeit besonderer Aufmerksamkeit und Geübtheit, alles das macht die Methode *Schützenberger-Risler* umständlich und zeitraubend und setzt sie ungeachtet aller zufriedenstellenden Genauigkeit Zufälligkeiten aus".

C. Die Methode von Thresh.

Eine äußerst selten erwähnte Arbeit ist eine von *Thresh* (18[illegible] ausgearbeitete Methode, deren grundlegendes Prinzip darin beste[illegible] daß dem Wasser, dessen Sauerstoffgehalt bestimmt werden soll, Jo[illegible] kalium und Nitrit nebst einer gewissen Quantität einer Säure zugese[illegible] wird. In diesem Falle fungiert die salpetrige Säure als Katalysat[illegible] dabei wird der im Wasser vorhandene Sauerstoff in eine äquivalen[illegible] Menge freies Jod umgesetzt. Diese Methode erfordert gleich der vorhe[illegible] gehenden den Ausschluß des atmosphärischen Sauerstoffs bei d[illegible] Titration des frei gewordenen Jods, was auch hier dadurch erreic[illegible] wird, daß man durch die erforderliche Apparatur einen Strom vo[illegible] Leuchtgas schickt. Das Verfahren wird also recht kompliziert un[illegible] schwerfällig. Übrigens schließt diese Manipulation keineswegs ein[illegible] O_2-Zufuhr aus, da auch das bei der Titration hinzugefügte Reagen[illegible] besonders das Hyposulfit, freien Sauerstoff enthält. Gleichfalls wir[illegible] durch das Nitrit der in dieser Substanz lose gebundene Sauer[illegible] stoff zugeführt; es ist daher notwendig, um den Wert des im Wasse[illegible] vorhandenen Sauerstoffs zu ermitteln, den ursprünglichen Wert ebe[illegible] im Hinblick auf diese Fehlerquellen zu korrigieren. *Thresh* arbeitet[illegible] auch ein derartiges detailliertes Korrektionsverfahren aus. Natürlic[illegible] treffen die Einwände, die gegen die vorhergenannten Methoden erhobe[illegible] wurden, in hohem Grade auch auf diese zu. Besonders *Letts* und *Blak*[illegible] (1900), welche die Methode kontrollierten, hoben hervor, daß die er-reichten Resultate mit großer Unsicherheit behaftet sind.

Tatsächlich liegt die Unsicherheit der Methode außer in der umständlichen Apparatur auch im Korrektionsverfahren. Ich habe selbst ein Bestimmungsverfahren ausgearbeitet, das gleich *Threshs* Methode von der katalytischen Fähigkeit der salpetrigen Säure, den elementaren O_2 in J_2 umzusetzen, ausgeht. Ich suche aber den atmosphärischen Sauerstoff bei der Titration nicht durch Apparaturanordnungen auszuschalten, sondern füge unmittelbar vor der Titration eine erforderliche Menge Natriumazid hinzu, welches die durch den hinzukommenden O_2 regenerierte salpetrige Säure augenblicklich zerstört. In den vielen Analysen, die ich bei der Prüfung dieses Verfahrens ausführte, erhielt ich sehr befriedigende Werte, doch war mit Rücksicht auf die hinzugefügte Nitritquantität eine Korrektur notwendig. Diese ist aber viel komplizierter als *Thresh* annahm, denn während der katalytischen Einwirkung der salpetrigen Säure verwandelt sich diese auf Kosten des im Wasser vorhandenen elementaren Sauerstoffs zum größeren oder geringeren Teil in Salpetersäure. Die Korrektur ist daher nicht immer dieselbe, wie *Thresh* glaubte, sondern ihr Wert ändert sich im Verhältnis zur Menge des umgesetzten Sauerstoffs und kann bei ge-

zügend hoher Sauerstoffkonzentration einen Wert ergeben, der zu dem durch die Titration erhaltenen Wert hinzu zu *addieren* ist.

Dieses Verfahren, das ich in einer späteren Abhandlung näher beschreiben werde, steht insofern unter der *Winkler*schen Methode, als es zum Teil auf Bedingungen basiert, deren Variabilität sich nur auf empirischem Wege feststellen läßt. Sie ist ihr aber nicht nur im Hinblick auf die einfache Ausführung überlegen, sondern sie gestattet auch ein ganz anderes Korrektionsverfahren in Gegenwart störender Substanzen, denen gegenüber die *Winkler*sche Methode sehr empfindlich ist.

D. Die Bestimmungsmethode Mohrs und ihr nahestehende Verfahren.

Im Gegensatz zum eben erwähnten Verfahren spielte die von *Mohr* (1862) veröffentlichte Analysenmethodik eine recht bedeutende Rolle; von manchen Forschern wird sie noch jetzt als anderen analytischen Verfahren überlegen angesehen. Bei dieser Bestimmung sowie bei der damit eng verknüpften *Levy*schen Modifikation (ref.: *Chlopin*, 1898) wird dem Wasser Alkali (nach *Mohr* Kalilauge; nach *Levy* kohlensaures Kali) und darauf eine bestimmte Menge *Mohr*sches Salz (Ammoniumferrosulfat) zugesetzt, wobei der im Wasser gelöste elementare Sauerstoff das entstandene Ferrohydrat zu Ferrihydrat oxydiert. Hat die Probe eine längere Zeit hindurch gestanden, so wird sie mit Schwefelsäure angesäuert und der Überschuß an Ferrosalz mit Kaliumpermanganat zurücktitriert. Auch hinsichtlich dieser Methode sind die Ansichten sehr geteilt. Nach den Untersuchungen *Chlopins* (1898) steht es jedoch fest, daß die zur Absorption des gesamten im Wasser gelösten Sauerstoffs erforderliche Zeit sowie die Temperatur für das Resultat dieser Methodik bedeutungsvolle Faktoren darstellen und daß das Ergebnis keineswegs immer einwandfrei ist. *Chlopin* erhielt bei der Analyse von Trinkwasser und destilliertem Wasser Werte, die durchschnittlich um 26,9 Proz. niedriger sind als die gleichzeitig nach der *Winkler*schen Methode erhaltenen Resultate. Er zieht daraus folgenden Schluß: „Die Methode *Mohr-Levy* gibt ungenaue Resultate und stets niedrigere Werte, so daß ihre Anwendung, ungeachtet ihrer Einfachheit und der Schnelligkeit ihrer Ausführung, in der sanitären Praxis nicht zu empfehlen ist". Natürlich besteht keine Veranlassung, bei Untersuchung von verunreinigtem Wasser bessere Werte als nach der *Winkler*schen Methode zu erwarten, denn da das Verfahren im großen und ganzen dieselben Prinzipien verfolgt, so muß es denselben Störungen unterworfen sein. Hinzu kommt noch die Schwierigkeit der Rücktitration mit Kaliumpermanganat, das als starkes Oxydationsmittel außer auf die Ferrosalze auch auf die übrigen vorhandenen oxydierbaren Stoffe oxydierend wirkt.

Eine der besten Modifikationen wurde von *Letts* und *Blake* (1900 ausgearbeitet. Diese Forscher geben zu der mit Ferrosalz versetzte Probe anstatt Kalilauge oder Kaliumcarbonat eine starke Ammoniak lösung, worauf man die Probe 15 Minuten stehen läßt, dann ansäuer und den Ferroüberschuß durch Titration mit Permanganat oder Bi chromat bestimmt. Gleichzeitig titriert man eine Doppelprobe desselbe Wassers, dem die gleiche Menge Ferrosalz wie der eigentlichen Analysen probe zugesetzt worden ist, aber ohne Beigabe von Alkali, ebenfall mit Permanganat oder Bichromat. Von dem so erhaltenen Wer subtrahiert man bei der Berechnung des Sauerstoffgehalts den Wer der mit Ammoniak behandelten Probe. Natürlich erreicht man au diese Weise auch eine Korrektion hinsichtlich der verunreinigenden reduzierenden Stoffe.

Bei einigen wenigen Analysen, die ich nach dieser Methode mit reinem Wasser ausführte, konnte ich mich davon überzeugen, daß sie in diesem Falle wirklich korrekte Werte gibt. Gleichzeitig fand ich aber, daß die Methode, wenn man sie mit der weiter unten zu besprechenden vergleicht, äußerst schwerfällig ist. Das beruht auf folgenden Umständen. Die Analyse muß mit doppelten Proben ausgeführt werden; man muß darauf achten, daß die Menge des hinzugefügten Ferrosulfats in beiden Proben genau gleich ist, und endlich besteht die Analyse in einer Resttitration, weshalb die Fehler besonders bei der Analyse geringer Sauerstoffmengen groß werden müssen. Besonders umständlich ist das Verfahren, wenn es sich um die Sauerstoffzehrung in Wasser handelt, da hier mindestens vier Proben notwendig sind. Ferner ist die Methodik der weiter unten beschriebenen *Winkler*schen Methode auch deshalb nicht gewachsen, weil eine Titration mit Permanganat erforderlich ist. Diese gestattet keine so genaue Analyse wie die jodometrischen Methoden, bei denen man viel schwächere Lösungen anwenden kann. Besteht die Probe aus Meerwasser oder ziemlich verunreinigtem Wasser, so ergibt die Rücktitration auf Grund der Untersuchung der Verfasser schlechte Werte[1]), und man benutzt in diesem Falle die Titration mit Bichromat. Letzteres Verfahren gehört aber keinesfalls zu denjenigen „which a person of ordinary intelligence, and without any special chemical training, could be easily taught to perform", wenigstens, wenn man den gebräuchlichen Handbüchern glauben darf (siehe *Treadwell*, 1923, S. 545), denn hier wird der Umschlag durch Tropfenindikation mit Ferricyankalium als

[1]) Einer der hier mitgeteilten Werte (siehe *Letts* und *Blake*, l. c., S. 466) wäre bei richtiger Berechnung tatsächlich negativ, d. h. der Permanganatverbrauch war in der alkalischen Probe größer als in der Parallelprobe. Das deutet auf eine interessante Tatsache hin, die ich später sehr eingehend behandeln werde.

Indikator ermittelt. Ich untersuchte das Verfahren nicht direkt, muß aber doch darauf hinweisen, daß es zweifelhaft sein muß, da die vorhandenen störenden Substanzen im allgemeinen so beschaffen sind, daß sie einen scharf fixierten Umschlag unmöglich machen.

Wenn es sich darum handelt, die Menge organischer, reduzierender Substanz durch Permanganatoxydation zu bestimmen (und natürlich liegt kein prinzipieller Unterschied vor, wenn man anstatt dessen Bichromat benutzt), so läßt sich das nicht in Form einer direkten Titration durchführen, sondern es sind recht komplizierte Verfahren notwendig, um einen deutlichen Umschlag zu erzielen. Z. B. reagieren schwefelhaltige reduzierende Stoffe auf diese Oxydationsmittel durchaus nicht immer in derselben Weise, vielmehr verlaufen die Reaktionen hier sehr schlecht. Sind sie vorhanden, so ist der O_2-Gehalt im allgemeinen niedrig und das Resultat der Resttitration wird hier besonders deshalb sehr unsicher, weil die störenden reduzierenden Substanzen die Fehlergrenze noch weiter vergrößern und den Umschlagspunkt unsicher machen. Dazu tritt noch ein Umstand, auf den ich noch zurückkommen werde.

Übrigens gibt es störende Substanzen (die Nitrite), die nach der Methode *Letts* und *Blakes* nicht eliminiert werden, was die beiden Forscher auch selbst fanden.

Buswell und *Gallaher* (1923) betonten sehr scharf die Überlegenheit der eben referierten Methoden gegenüber der *Winkler*schen Methodik in gewissen Fällen, berücksichtigten aber dabei nicht die komplettierenden Korrektionsmethoden, die man unter solchen Umständen anzuwenden pflegt.

Dagegen gehe ich hier nicht auf die verschiedenen kolorimetrischen Methoden ein, die mit Rücksicht auf die O_2-Absorptionsfähigkeit der Ferroverbindungen ausgearbeitet wurden.

E. *Winklers Bestimmungsmethode.*

1. *Prinzipien der Winklerschen O_2-Bestimmungsmethode.* Die neben der gasometrischen Methode unbedingt wichtigste aller sauerstoffanalytischen Methoden ist das von *Winkler* (1888) ausgearbeitete Verfahren, das auch am gebräuchlichsten ist. Es besteht ursprünglich darin, daß man die Probe mit Manganchlorür und jodkaliumhaltiger Natronlauge versetzt. Dabei entsteht eine Fällung, die stark O_2-absorbierend wirkt, indem sie zu höheren Oxydhydraten, wahrscheinlich Manganomanganit oder entsprechenden Hydraten oxydiert wird (*Winkler*, 1914).

$$MnCl_2 + 2\,NaOH = 2\,NaCl + Mn(OH)_2 \qquad (1)$$

$$4\,Mn(OH)_2 + O_2 + 2\,H_2O = 4\,Mn(OH)_3 \qquad (2)$$

Die Fällung wird in einer Säure aufgelöst, und durch das vorhei hinzugefügte Jodkalium gestaltet sich diese Reaktion folgendermaßen

$$Mn(OH)_3 + 3\,HCl = MnCl_3 + 3\,H_2O, \quad (3)$$

$$2\,MnCl_3 + 2\,KJ = 2\,MnCl_2 + 2\,KCl + J_2. \quad (4)$$

Das ausgeschiedene Jod wird in der gewöhnlichen Weise ver mittelst einer quantitativ eingestellten Hyposulfitlösung und Stärke als Indikator analysiert.

$$2\,Na_2S_2O_3 + J_2 = 2\,NaJ + Na_2S_4O_6. \quad (5)$$

2. *Die Probeflaschen zur Winklerschen Analysenmethodik.* Die Probeflaschen, welche ich bei meinen Untersuchungen verwendete, enthalten ungefähr 125 ccm. Größere Probeflaschen sind vollkommen unnötig, denn die Analysenwerte werden dadurch keineswegs besser, worauf z. B. *Bruhns* (1915) hinwies. Im Gegenteil sind größere Proben sogar von Nachteil, da sie unnötig viel Reagens verbrauchen und eine überflüssige Belastung bilden, wenn es sich um Untersuchungen außerhalb des Laboratoriums handelt. Bei experimentellen Bedingungen ist es manchmal nicht einmal notwendig, Proben von 125 ccm zu verwenden; man kann sich mit einem geringeren Volumen, z. B. 25 bis 30 ccm (*Allison* und *Shive*, 1923) oder sogar 5 bis 10 ccm (*Lund*, 1921) begnügen, aber damit wird natürlich auch der Reagenzzusatz anders. Am besten ist es, wenn die Pfropfen schräg oder konisch geschliffen sind; nach *Winklers* eigener Angabe (1914) ist das aber keineswegs notwendig, nur dürfen sie auf keinen Fall exkaviert sein.

3. *Die Pipetten.* Die Pipetten müssen „Vollpipetten" oder noch besser „Meßpipetten" sein, die untere Markierung muß 2 bis 3 ccm von der Ausflußöffnung entfernt sein.

4. *Das Manganchlorürreagens.* Bezüglich der verschiedenen Reagenzien sind mit Rücksicht auf Konzentration und Beschaffenheit mehrere Forderungen aufzustellen. Die Manganchlorürlösung wird so hergestellt, daß man 40 g kristallisiertes Salz ($MnCl_2, 4\,H_2O$; *pro analysi*-Präparat *Merck*) in 80 ccm Wasser auflöst. Die Lösung nimmt ein Volumen von ungefähr 100 ccm ein. Das Präparat enthält meist Eisen als Verunreinigung (so auch mein *pro analysi*-Präparat), ein Umstand, der auf die Anwendbarkeit des Präparats äußerst nachteilig einwirkt. „Man achte darauf, daß das Manganchlorid nicht mit Eisen verunreinigt sei. Aus einer angesäuerten Jodkaliumlösung scheide es höchstens Spuren von Jod aus" (*Winkler*, 1888). Im allgemeinen dürfte aber das Eisen in den Manganchlorürpräparaten in *zweiwertiger* Form vorhanden sein, und dann kommt natürlich keine Jodausscheidung zustande. Da Eisen in dieser Form auch in minimalen Quantitäten ganz außerordentlich störend wirkt, wenigstens wenn man Schwefel-

säure oder Phosphorsäure zum Ansäuern verwendet, so darf die Prüfung des Präparats *nie* unterlassen werden. Man nimmt 1 ccm der nach dem mitgeteilten Rezept zubereiteten Lösung, verdünnt sie mit etwa 20 ccm H_2O, versetzt sie mit 1 bis 2 ccm starker HCl und einigen Tropfen Bromwasser und fügt dann 1 bis 2 ccm 10proz. Rhodankaliumlösung hinzu, ohne einen eventuellen Bromüberschuß vorher zu entfernen; tritt Rotfärbung ein, so ist das Präparat eisenhaltig. In diesem Falle kann das Reagens nicht ohne weiteres verwendet werden, sondern die Verunreinigung ist zuerst zu entfernen. Man gibt 0,5 g pulverisiertes Natriumbicarbonat zum Reagens hinzu, wodurch die Lösung, die zumeist sauer reagiert, neutralisiert wird. Dann muß man die Lösung 24 Stunden lang stehenlassen, worauf man die Fällung, welche das vorhandene Eisen enthält, abfiltriert; nunmehr ist das Reagens gereinigt. Von diesem Reagens, das man am besten in einer Flasche mit Glasstöpsel aufbewahrt, nimmt man 1 ccm für jede Probe. Wenn man das Reagens hinzugibt, wird die Spitze der Pipette in die Flüssigkeit eingetaucht.

5. *Die jodkaliumhaltige Natronlauge.* Die jodkaliumhaltige Natronlauge wurde bereitet, indem man 40 g Natronhydrat und 20 g Jodkalium zu 80 ccm Aqua dest. mischte. Die Lösung nimmt ungefähr ein Volumen von 100 ccm ein. Bezüglich des Natronhydrats schrieb *Winkler* (1888) vor, man versetze am besten Na_2CO_3 mit CaO, da gewöhnliches Natronhydrat durch Nitrit verunreinigt ist. Ich verwendete nach Vorschrift das als „*ex natr. met.*“ bezeichnete Präparat von *Merck* und *de Haën*, fand aber nach zahlreichen Proben, daß weder *Mercks* Präparat „*Natr. hydr. purus in bacillis*“ noch „Natriumhydrat purum; Elektrokemiska Aktiebolaget, Sweden“ Stoffe enthalten, die das Präparat für die Analyse unbrauchbar machen. Dagegen ist das Präparat „*Natr. hydr. depuratus in bacillis*“ von *Merck* durch Nitrit verunreinigt und unbrauchbar. Ich untersuchte auf Nitrit, indem ich einen kleinen Teil des Präparats (0,4 g) mit Salzsäure und alkoholischem Indol oder mit Salzsäure, Jodkalium und Stärkelösung versetzte. Bei negativem Ausfall der letzten Probe gab ich zu derselben Lösung einen Tropfen einer ungefähr n/100 Jodlösung, worauf Blaufärbung auftrat; es konnten folglich keine reduzierenden Stoffe mehr vorhanden sein. Außerdem machte ich direkte Sauerstoffanalysen, parallel mit Analysen, bei welchen Natronhydrat „*ex natr. met.*“ verwendet wurde und die dasselbe Resultat ergaben.

Betreffs der Größe des für jede Probe notwendigen Jodkaliumzusatzes bestehen sehr verschiedene Vorschriften, denn teils sind die empfohlenen Probevolumina sehr ungleich, teils schreiben verschiedene Verfasser verschiedene Volumina der für die Behandlung der Probe notwendigen jodkaliumhaltigen Natronlauge vor, und endlich variieren

die verschiedenen Rezepte mit Rücksicht auf die Zusammensetzung des Reagens auch mit Rücksicht auf die Jodkaliumkonzentration Ich fand es am besten, für jede Probe 1 ccm Reagens zu verwenden, also 0,2 g Jodkalium, was im Hinblick auf das relativ geringe Volumen der Probe einen recht großen Prozentsatz ausmacht Im allgemeinen wurde die wichtige analytische Rolle, welche eine Variation in der KJ-Konzentration spielt, nur wenig beachtet. So wird bei der Ansäuerung der Probe, die von stark O_2-haltigem Wasser herrührt, eine besondere Vergrößerung der hinzugefügten Säuremenge vorgeschrieben, falls sich die Fällung nur schwer löst. Tatsächlich beruht aber diese Schwierigkeit gerade darauf, daß der Jodkaliumzusatz zu klein ist; durch einen weiteren Zusatz von KJ lösen sich solche schwer lösliche Proben sehr leicht. Ein Mangel an KJ kann aber außerdem auch bedeutende Störungen im analytischen Resultat verursachen, falls in der Probe organische Stoffe vorhanden sind. Wie wir sehen werden, besitzen diese in saurer Lösung gegenüber der oxydierenden Wirkung der höher oxydierten Manganverbindungen eine recht starke Resistenz, doch tritt bei Mangel an KJ, auf das die Manganverbindungen sonst einwirken können, eine nicht geringe Beeinflussung ein. Wiewohl ich Reagenzien und Verlauf der Analyse noch nicht ganz beschrieben habe, will ich hier zur Verdeutlichung dieses Umstandes eine Versuchsreihe vorausschicken.

Zu allen Proben der Serie wurde das gleiche Wasser unmittelbar nacheinander genommen und danach mit dem Reagens versetzt. Anfangs- und Schlußprobe der Reihe wurden nach der gebräuchlichen *Winkler*-methodik behandelt, wobei ich den Proben Manganchlorürlösung und jodkaliumhaltige Natronlauge in den vorher genannten Mengenverhältnissen zusetzte, aber keine störende Substanz. Zu den eingeschobenen Proben (sechs Stück; die wiedergegebenen stellen Mittelwerte dar von je zwei Proben) gab ich je 1 ccm 10proz. Oxalsäure sowie verschiedene Mengen Jodkalium, sonst aber dieselben Reagenzmengen wie gewöhnlich.

In der Tabelle I sind die den eingeschobenen Proben zugefügten KJ-Mengen angegeben. Nachdem sie 15 Minuten gestanden hatten, wurden sie mit 50proz. Schwefelsäure behandelt und nach der üblichen Methode titriert. Bei der Berechnung der absoluten und prozentualen Fehlergröße ging ich hier sowie später in dieser Abhandlung vom Mittelwert des Sauerstoffgehalts aus. Dieser wurde aus den Anfangs- und Schlußproben bestimmt, denen keine störenden Substanzen beigegeben wurden.

Tabelle I.

Jodkaliumzusatz g pro Probe	Oxalsäurezusatz g pro Probe	O_2-Menge ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
—	0,0	3,55	—	—
0,05	0,1	3,28	—0,28	—7,9
0,10	0,1	3,49	—0,07	—2,0
0,20	0,1	3,55	—0,01	—0,3
—	0,0	3,56	—	—

Wir können hier ohne weiteres die Bedeutung des Jodkaliumzusatzes konstatieren, und ich fand dieselbe Tatsache bei Analysen von mit verschiedenen organischen Stoffen versetzten Proben sehr oft. *Bruhns* (1915) übersah diesen Umstand ganz. Er betont den Vorteil eines geringen Jodkaliumzusatzes, die Verschwendung einer teuren Substanz zu vermeiden.

Übrigens möchte ich bezüglich des zu dieser Analyse notwendigen Jodkaliums darauf hinweisen, daß ich bei meinen Analysen oft KJ verwenden konnte, das nicht als *pro analysi* bezeichnet war. Ich fand aber auch, daß solche Präparate durchaus nicht immer so frei von oxydierenden oder reduzierenden Stoffen sind, daß sie eine solche Anwendung gestatten. Darum halte ich die Vorschrift für am sichersten, unbedingt immer kontrollierte *pro analysi*-Präparate von sicheren Firmen zu benutzen. Als Kontrollmethode verdient die Vorschrift *Winklers* (1915) hier mitgeteilt zu werden: „Es empfiehlt sich dringend, bevor man das Kaliumjodid zu den Untersuchungen benutzt, mit einer sicher nitritfreien Wasserprobe (*Winkler* empfiehlt Wasserleitungswasser) einen blinden Versuch auszuführen, indem man in 100 ccm 0,2 g Kaliumjodid löst, 1 ccm Stärkelösung und 5 ccm 25proz. Phosphorsäure [oder 10 ccm 10proz. Schwefelsäure[1])] hinzufügt und darauf die Flasche ins Dunkle stellt. Nach Verlauf von 3 Stunden muß die Flüssigkeit noch völlig farblos sein. Wird nun zu derselben ein Tropfen n/100 Jodlösung gegeben, so muß sie sich bläuen. Anderenfalls sind im Jodkalium oder in den Säuren reduzierende Stoffe vorhanden".

Man gibt zu jeder Probe 1 ccm jodkaliumhaltige Natronlauge, und es ist hier am besten, wie beim Manganchlorürzusatz, eine „Meßpipette" zu verwenden, deren Ausflußöffnung mit Rücksicht auf die große Viskosität der Flüssigkeit nicht zu klein sein darf. Beim Reagenzzusatz wird die Pipette in die Flüssigkeit eingetaucht.

Man braucht das Reagens nicht in dunklen oder mit dunklem Papier umwickelten Gläsern aufzubewahren, denn KJ hält sich in alkalischer Lösung auch bei Licht. Im Gegenteil ist es von Vorteil, weißes Glas zu verwenden. Man riskiert dann nicht so sehr, die alkalische Flüssigkeit in den Mund zu saugen, da es sich kontrollieren läßt, ob sich die Pipettenspitze während des Aufsaugens unter der Oberfläche der Flüssigkeit befindet. Die Aufbewahrungsflasche muß mit einem Glasstopfen verschlossen sein. Man muß so weit als möglich darauf achten, daß er von der Flüssigkeit nicht befeuchtet wird, weil er dann leicht festgekittet wird. In diesem Falle trocknet man Stopfen und Flaschenhals innen mit Filtrierpapier aus.

---

[1]) Anmerkung des Verfassers.

6. *Die Säure zum Lösen der Fällung.* Beim Ansäuern der Pro
kommen mehrere Säuren in Betracht. *Winkler* schrieb (1888) zue
rauchende Salzsäure vor, empfahl aber später, wegen der Unannehmlic
keiten bei der Verwendung dieser Säure, Schwefelsäure oder unt
gewissen Bedingungen Phosphorsäure. Meiner Meinung nach ist l
der nicht modifizierten *Winkler*-Analyse Schwefelsäure anzuwende
Phosphorsäure dagegen in solchen Fällen, wo die Proben weg
vorhandener Verunreinigungen einer Vorbehandlung bedürfen, wiewo
die Anwendung dieser Säure auch in anderen Fällen gestattet, ab
nicht notwendig ist. Ich will später eine nähere Begründung gebe
Wenn die Probe unmittelbar nach dem Säurezusatz titriert werde
soll, muß die Schwefelsäure 50proz. sein, denn bei Verwendung ein
stärkeren Säure kann möglicherweise gerade dann eine Oxydatio
des in der Probe vorhandenen KJ stattfinden, wenn die Säure die
Substanz erreicht. Wurde die Titration dagegen einige Zeit nach de
Ansäuern vorgenommen, so verwendete ich jedoch konzentrierte Säur
denn man riskiert sonst eine Zufuhr überflüssiger Sauerstoffmenge
die nach und nach mit dem vorhandenen KJ eine Umwandlung e
leiden. Um die Fällung zu lösen, verwendete ich entweder 2 ccm 50pro
Säure oder 1 ccm konzentrierte. Diese Menge genügt immer. Ve
wendung und Zweck der Phosphorsäure werde ich später behandel

7. *Die Verwahrung der Proben bis nach der Analyse.* Was di
Behandlung der Probe nach der Entnahme anlangt, so verwendete
man in der analytischen Praxis sehr verschiedene Methoden, ohn
daß das eine oder andere Verfahren in der Literatur eine bestimmt
Begründung erhalten hätte. So ließen einige Analytiker die mi
Manganchlorür und Natronlauge versetzten Proben bis zur titri
metrischen Behandlung stehen und säuerten sie erst unmittelbar vorhe
an. Nach diesem Prinzip arbeiteten z. B. *Chlopin* (1898, S. 296) und
in neuerer Zeit *Sondén* (1912, S. 20), und diese Methode wird oft be
Meerwasseruntersuchungen benutzt. In amerikanischen Vorschrifte
(Standard methods of water analysis, S. 60) wird aber ausdrücklich
vorgeschrieben, daß die Ansäuerung nach einer bestimmten kurzen Zeit
zu erfolgen hat, worauf die Probe aufbewahrt wird, bis sich eine
Möglichkeit zur Titration bietet. Endlich verfuhren andere Autoren,
z. B. *Birge* und *Juday* (1911), so, daß sie die gewonnene Probe ohne
Reagenzzusatz aufbewahrten, bis eine Analyse ermöglicht werden
konnte. Beim zuletzt erwähnten Verfahren riskiert man aber, daß
der Sauerstoffgehalt der Probe wegen der stets vorhandenen *Sauerstoff-zehrung* eine Verminderung erfährt, was nur in reinem Wasser (und
auch hier nur bis zu einem gewissen Grade) vernachlässigt werden darf.
Von den beiden zuerst genannten Verfahren will ich zwei Versuchs-reihen wiedergeben.

Die erste (Tabelle II) bestand aus 15 Proben, die unmittelbar nacheinander demselben Wasser (Wasserleitungswasser) entnommen wurden. Die Anfangs- sowie die Schlußprobe der Serie bildete je eine gewöhnliche Probe, nach der *Winkler*methode ohne weitere Zusätze analysiert. Jeder der übrigen Proben der Serie wurden 1 ccm frische Milch und darauf die zur Winkleranalyse notwendigen Reagenzien zugesetzt. Während ich zwei dieser mit Milch versetzten Proben 10 Minuten nach der Probeentnahme analysierte (der Mittelwert der beiden Analysen wurde in die Einzelserie A eingetragen), ließ ich die anderen Proben vor der Analyse einige Zeit hindurch stehen. Die eine Hälfte dieser letzteren Proben, deren Analyse erst nach einer gewissen, für die verschiedenen Proben wechselnden längeren Zeit stattfand (vgl. die Einzelserie B, C und D), wurde 10 Minuten nach dem Manganchlorür- und Natronlaugezusatz mit 1 ccm konzentrierter H_2SO_4 angesäuert, während die andere Hälfte der Proben erst unmittelbar vor der Titration angesäuert wurde. Die in den Einzelserien A, B, C und D wiedergefundenen Werte unterscheiden sich voneinander hinsichtlich des Stehenlassens; sie sind alle Mittelwerte je zweier Analysen, die im übrigen im Hinblick auf das Resultat untereinander nur wenig differierten. Bei der Berechnung der Standzeit subtrahierte ich die ersten 10 Minuten, die zur Absorption des im Wasser vorhandenen Sauerstoffs durch die sauerstoffabsorbierende Fällung in der Probe notwendig waren.

Tabelle II.

	Milchzusatz	Standzeit vor dem Ansäuern Stunden	Standzeit vor der Analyse Stunden	O_2-Menge ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Aweichung Proz.
	0	0	0	3,56	—	—
A	1	0	0	3,34	— 0,25	— 7,0
B	1	0	19	3,23	— 0,36	— 10,0
	1	19	19	2,20	— 1,39	— 38,7
C	1	0	24,5	3,19	— 0,40	— 11,1
	1	24,5	24,5	1,91	— 1,68	— 46,8
D	1	0	36,5	3,12	— 0,47	— 13,1
	1	36,5	36,5	1,00	— 2,59	— 72,1
	0	0	0	3,62	—	—

Wie aus der Tabelle ohne weiteres zu ersehen ist, übt selbst ein minimaler Zusatz einer anscheinend recht harmlosen Substanz einen sehr ungünstigen Einfluß auf das Analysenresultat aus. Noch interessanter ist es aber, den Einfluß des Stehenlassens kennenzulernen. Man würde natürlich erwarten, daß eine lange Standzeit einen ungünstigen Einfluß auf den Analysenwert ausübt, aber diese Einwirkung ist verschieden und beruht darauf, ob die Probe angesäuert oder ohne Säure gestanden hat. Während die angesäuerten Proben an Stärke relativ wenig verlieren, *geht der Sauerstoff in den alkalischen Proben mehr und mehr verloren.* Es ist infolgedessen am besten, als kleineres Übel das amerikanische Standardverfahren anzunehmen, während das Stehenlassen der Proben ohne Säure zu verwerfen ist, da es unter gewissen Umständen zu vollkommen unrichtigen Resultaten führen

kann. Soweit ich die Literatur verfolgte, betonte nur *Bruhns* (19
ohne jedoch eingehendere analytische Daten anzuführen, daß es schäd
sei, die Proben mit Lauge längere Zeit hindurch stehenzulassen,
Hinweis, der viel zu wenig beachtet wurde.

Um diesen wichtigen Umstand zu veranschaulichen, den
immer bestätigt fand, will ich noch eine Analysenreihe anführen,
Proben aus einem ziemlich verunreinigten Teiche umfaßt.

Die Serie ist nach denselben Prinzipien angeordnet wie die frü
angeführte, doch wurden Anfangs- und Schlußprobe dem verunreinig
Teichwasser entnommen, da Proben ohne die vorhandenen Verunreinigun
aber mit gleichzeitiger Beibehaltung des Sauerstoffgehalts natürlich ni
erhältlich waren. Den Proben, die sofort angesäuert wurden, misc
ich 1 ccm konzentrierter H_2SO_4 bei.

Tabelle III.

	Standzeit vor dem Ansäuern Stunden	Standzeit vor der Analyse Stunden	O_2-Menge ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichun Proz.
Anfangsprobe	0	0	3,16	—	—
A	0	5,5	3,10	—0,05	—1,6
A	5,5	5,5	3,03	—0,12	—3,8
B	0	24,5	3,01	—0,14	—4,4
B	24,5	24,5	2,98	—0,17	—5,4
C	0	28,5	3,06	—0,09	—2,9
C	28,5	28,5	2,97	—0,18	—5,7
Schlußprobe	0	0	3,13	—	—

Auch hier finden wir die gleichen Verhältnisse, wenn auch
bedeutend verringertem Maße. Zieht man diese Umstände nicht
Betracht, so können O_2-Analysen nahezu wertlos werden, besond
wenn es sich um stärker verunreinigtes Wasser handelt, und v
allem dann, wenn die Sauerstoffzehrungsfähigkeit eines solchen v
unreinigten Wassers bestimmt werden soll.

8. *Die Titration der Probe.* Um die Quantität des ausgeschieden
Jods zu bestimmen, verwendet man eine n/100 Hyposulfitlösu
Man erhält eine solche Lösung, wenn man ungefähr 2,5 g kristallisiert
Hyposulfit ($Na_2S_2O_3$, 5 H_2O) in 1 Liter Wasser auflöst. Theoretis
braucht man 2,4812 g Salz für 1 Liter, da aber die Lösung mit Hi
einer Urtitersubstanz eingestellt werden muß, ist ein genaueres A
wägen des Hyposulfits nicht notwendig. Hinsichtlich der Konsta
der Hyposulfitlösung sind verschiedene Ansichten ausgesprochen.
hielten z. B. *Treadwell* (1923) und *Banco* (1917) die Lösung für vo
kommen haltbar, während *Bruhns* (1917) und *Abel* (1923) energis
darauf hinwiesen, daß die Lösung nicht haltbar sei. Auf Grund mein
mehrjährigen analytischen Arbeit, bei der ich täglich solche Lösung
verwendete, muß ich der Behauptung der letzterwähnten Verfasser oh

weiteres beistimmen. Obgleich die Lösung gegen CO_2-Zufuhr geschützt war (indem sie in Büretten aufbewahrt wurde und durch ein Natronkalkröhrchen von der Luft abgesperrt war), konstatierte ich stets eine mehr und mehr abnehmende Stärke der Lösung. *Kolthoff* (1919) gab mehrere Vorschriften betreffs der Herstellung der Lösung, die dadurch haltbar werden sollte, doch konnte ich das Verfahren bis jetzt nicht nachprüfen. Als Indikator verwendet man am besten Stärkelösung. Sie wird hergestellt, indem man in Wasser gut aufgeschlemmte Stärke portionsweise in siedendes Wasser gibt. Durch dieses Verfahren vermeidet man Klumpenbildung. Etwa 1 g Stärke reicht für 200 ccm Lösung, zu jeder Probe gibt man 2 ccm dieser Lösung. Mit der Zeit bildet sich auf der Lösung Schimmel und sie zersetzt sich, so daß sie unbrauchbar wird. Zur Konservierung kann man 20 g reines Kochsalz hinzufügen; solche Lösungen hielten sich nach meiner Erfahrung mehrere Monate hindurch. Andere Forscher (*Birge* und *Juday*, 1911) empfahlen zu demselben Zwecke einen Zusatz von Chloroform, ein Verfahren, das ich nicht untersuchte. Um den Umschlag zum farblos scharf beobachten zu können, stellt man während des Titrierens den die Probe enthaltenden Erlenmeyerkolben auf einen weißen Teller, auf den man etwas Wasser gegossen hat.

9. *Titereinstellung des Hyposulfits.* Im allgemeinen empfehlen die hydrochemischen Handbücher zur Einstellung des Hyposulfits die Verwendung von Bichromat in Form einer n/100 Lösung. In späterer Zeit gelangte man aber bei den Kontrolluntersuchungen über die Zuverlässigkeit dieser Einstellungsmethode zu sehr verschiedenen Resultaten, und die von mir selbst ausgeführten Untersuchungen fielen keineswegs immer zugunsten dieser Methode aus. Bei meiner Arbeit über verschiedene Titereinstellungsmethoden gelang es mir, ein neues Verfahren aufzufinden, das ich gerade für den hydrobiologischen Gebrauch empfehlen will (*Alsterberg*, 1926). Bezüglich näherer Einzelheiten im Verfahren verweise ich auf meine eben erwähnte Untersuchung.

II. Modifikationen der Winklerschen Analysenmethode und verschiedene Korrektionsverfahren bei der Anwendung.

Die *Winkler*sche Methode läßt sich ohne weiteres als solche anwenden, doch kommen ab und zu Komplikationen vor, die sie nicht ohne weiteres als geeignet erscheinen lassen. Übrigens dürften die Fälle, wo sich die *Winkler*methode wegen der im Wasser vorhandenen Verunreinigungen nicht direkt anwenden läßt, noch häufiger sein, als man annimmt. Gewöhnlich wird durch diese Komplikationen ein zu niedriges Analysenresultat erhalten, manchmal aber auch ein zu großes.

Für eine genauere Bestimmung hat man verschiedene Korrektions verfahren ausgearbeitet. Ich will im folgenden die wichtigsten Methode behandeln.

Ferner versuchte man die *Winkler*sche Methode in verschiedene Weise zu modifizieren, um sie zu vereinfachen, doch existiert bis jetz kein besonders empfehlenswertes Verfahren.

A. Korrektionsmethoden, wobei die Parallelproben mit Manganichlorid behandelt werden.

1. Manganichloridverfahren nach Winkler. Winkler arbeitete (1888 Methoden für die O_2-Analyse von mit Nitriten, organische Stoffen usw. verunreinigtem Wasser aus, die er auch mit verschiedene Abänderungen in einer bedeutend später publizierten Abhandlung (*Winkler*, 1914) zur Kenntnis brachte. Die Methode besteht im große und ganzen in folgendem Verfahren: man versetzt die Analysenprobe mit Manganchlorür und Natronlauge *ohne Jodkalium*; die Fällung wird durch einen Zusatz von Salzsäure aufgelöst und erst ***dann*** gibt man Jodkalium hinzu. Es ist klar ersichtlich, daß im Analysenresultat ein bedeutendes Defizit entstehen muß, da die vorhandenen oxydierbaren Stoffe durch das entstandene Manganichlorid oxydiert werden. *Winkler* suchte nun dieses Defizit dadurch zu vermeiden, daß er zu einer Parallelprobe desselben Wassers eine bekannte Quantität Manganichlorid gab, welches die vorhandene verunreinigende Substanz oxydierte, worauf der Überschuß an zugefügtem Oxydationsmittel jodometrisch bestimmt wurde. Durch eine Subtraktion des Überschusses von der Totalmenge zugeführten Manganichlorids wurde das *Defizit* erhalten, das nun zu dem zuerst erhaltenen O_2-Analysenwert zugezählt werden sollte. Die Methode ist umständlich und vor allem *ganz falsch*. Die Theorie geht davon aus, daß der O_2-Verlust erst bei der Auflösung der Fällung eintritt, d. h. wenn die Probe angesäuert wird. Doch geben uns die hier mitgeteilten Analysenserien wichtige Aufklärungen darüber. Das Defizit entsteht bereits *im alkalischen Stadium*, und zwar durch einen Prozeß, der um so mehr störend einwirkt, je länger man die Probe ohne Säurezusatz stehen läßt. Die Korrektionsmethode arbeitet *in saurer Lösung*, und die erhaltenen Resultate müssen notwendigerweise ganz anders werden, da die meisten Oxydations- und Reduktionsprozesse in alkalischem und saurem Milieu in völlig verschiedener Weise verlaufen. Der Wert der Methode war auch sehr umstritten, ohne daß man den Fehler finden konnte.

2. Das Manganichloridverfahren nach Noll. Diese Kritik der *Winkler*methode trifft auch das Verfahren von *Noll* (1905). Hierbei erhält man die Korrektur dadurch, daß man die Parallelprobe zuerst mit Jodkalium und nachher mit Manganichlorid versetzt.

B. Voroxydierungsmethoden mit Permanganat.

Eine Methode, die in England und Amerika allgemeines Ansehen genießt, ist die von *Rideal* und *Stewart* (1901) ausgearbeitete Vorbehandlungsmethode der Probe durch einen Zusatz von Permanganat und Schwefelsäure. Hat dieser Zusatz eingewirkt, so reduziert man den Überschuß durch einen Zusatz von Oxalsäure. Bezüglich der Anwendung dieser Methode will ich zuerst Standard Methods of Water Analysis, 1923, S. 59ff. anführen, wo die Methode zum allgemeinen Gebrauch bei Sauerstoffanalysen empfohlen wird. Die Reagenzien zur Vorbehandlung sind: konzentrierte Schwefelsäure, Kaliumpermanganat (6,32 g pro Liter) und Kaliumoxalat (20 g pro Liter). „Remove the stopper from the bottle (250 bis 270 cm) and add first 0.7 ccm of the concentrated sulfuric acid, and then 1 ccm of the potassium permanganate solution. These and all other reagents should be introduced by pipet under the surface of the liquid. Insert the stopper and mix by inverting the bottle several times. If a noticeable excess of potassium permanganate is not present after 20 minutes again add 1 ccm of the permanganate solution; is this still insufficient, use a stronger permanganate solution. After 20 minutes have elapsed destroy the excess of permanganate by adding 1 ccm of potassium oxalate solution, re-stopper the bottle at once and mix its contents."

Da die Menge der Verunreinigungen im Wasser die oben bzw. in allgemeinen Fällen bestimmte Dosierung oft weit übertrifft, beschloß ich, die Reagenzmenge dadurch zu erhöhen, daß ich zu jeder Probe (125 ccm) 0,5 ccm einer etwa n/1 Kaliumpermanganatlösung (= 3,2 g pro 100 ccm Lösung) und zur Reduktion des Überschusses 1 ccm n/1 Oxalsäurelösung (7 g pro 100 ccm Lösung) hinzugab; diese Menge muß genügen, um selbst die ganze hinzugefügte Permanganatmenge zu reduzieren. Doch traten anscheinend sehr sonderbare Störungen auf. Um dies zu demonstrieren, will ich eine Versuchsreihe wiedergeben, wo ich die eben genannten Reagenzmengen verwendete.

Die acht Proben wurden unmittelbar nacheinander demselben durchlüfteten Aqua dest. entnommen. Anfangs- und Schlußprobe waren regelrechte *Winkler*proben, die zeigen sollten, daß während des Verlaufs der Probeserie keine Veränderung im Sauerstoffgehalt erfolgt war. Ferner wurden zwei Blindproben genommen, deren Analysenmittelwert in Tabelle IV Einzelserie A zu ersehen ist, und zu welchen ich 1 ccm n/1 Oxalsäure, 0.35 ccm konzentrierte Schwefelsäure und nach 20 Minuten die *Winkler*schen Reagenzien sowie weitere 2 ccm 40proz. NaOH gab. Die vier übrigen Proben wurden mit 0,5 ccm Permanganatlösung und mit denselben Mengen Oxalsäure und Schwefelsäure versetzt wie die Blindproben. Zwei Proben (Mittelwerte in der Einzelserie B) wurden unmittelbar nach der vollständigen Klärung (20 Minuten) mit den *Winkler*schen Reagenzien und mit 2 ccm 40proz. NaOH versetzt, während die beiden anderen (Analysenmittelwert in der Einzelserie C) 20 Stunden stehenblieben,

ehe die *Winkler*behandlung erfolgte. Unmittelbar nachdem sich die Fällu sedimentiert hatte, wurde die Analyse in der üblichen Weise vorgenomme

Tabelle IV.

	Oxalsäurezusatz ccm	Permanganatzusatz ccm	O_2-Menge ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichun Proz.
Anfangsprobe	0	0	4,85	—	—
A	1	0	4,87	+ 0,03	+ 0,6
B	1	0,5	4,26	— 0,56	— 11,6*
C	1	0,5	3,85	— 0,99	— 20,5*
Schlußprobe	0	0	4,82	—	—

*) Unmittelbare *Winkler*-Analyse. — **) *Winkler*-Analyse nach 20 Stunden.

Eigentümlicherweise ergeben die voroxydierten Proben einen vi *niedrigeren* Wert als die ursprünglichen *Winkler*analysen. Noch merl würdiger erscheint diese Tatsache bei einem Vergleich mit den Re sultaten der Blindproben. Die Oxalsäure kann nicht dafür verantwor lich gemacht werden, was auch nach den Resultaten in Tabelle I, S. 3 zu erwarten war. Offenbar nimmt während des Reaktionsverlau zwischen Permanganat und Oxalsäure das im Wasser gelöste O_2 a der Reaktion teil. Der Oxydationsverlauf ist keineswegs mit de Klärung der Probe nach der Permanganatreduktion abgeschlossen denn in den Proben existieren noch lange nachher oxydierende Stoffe die das Jod aus dem hinzugefügten Jodkalium frei machen. Deshal ergeben Proben, die man längere Zeit stehen läßt, noch negative Werte. So wurde der elementare Sauerstoff sichtlich *aktiviert*, und e entstand im späteren Verlauf der Analyse keine neue, reduktiv wirk same Substanz.

In einer anderen Untersuchung (*Alsterberg*, 1926) konstatiert ich, daß diese Sauerstoffaktivierung der Mangansuperoxydreduktio eigentümlich ist, die ein Glied in der Permanganatreduktion bildet ferner, daß sie nicht nur bei Reduktionen mit Oxalsäure vorkommt sondern auch in anderen Fällen, z. B. bei der Reduktion mit Rhodan kalium oder salpetriger Säure. Auch fand ich Werte, die es wahrschein lich erscheinen lassen, daß sie bei Reduktion mit schwefliger Säur erfolgt. Die hierher gehörigen Experimente sind jedoch recht um ständlich, auch noch nicht beendigt, weshalb ich sie hier nicht wieder gebe.

Ausgehend von den oben gefundenen Tatsachen, muß ich zu eine Prüfung der *Rideal-Stewart*-Methode als solcher übergehen. Ich will das Resultat einer Analysenserie mit durchlüftetem Aqua dest. wieder geben (Tabelle V).

Bei der Anwendung der Methode ging ich nur von den halben Quan titäten der für diese Methode vorgeschlagenen Reagenzmengen aus, da

meine Probeflaschen nur etwa das halbe Volumen aufnahmen. So gab ich 0,25 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 0,5 ccm n/5 Permanganat, 0,5 ccm Kaliumoxalat (2 g auf 100 ccm Lösung) und nachher 0,5 ccm Manganchlorürlösung und 1,5 ccm K J-Lauge (40proz. im Verhältnis zu konzentrierter NaOH) dazu. Anfangs- und Schlußproben wurden regelrecht nach *Winkler* analysiert.

Tabelle V.

Methode	O_2-Menge ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	4,63	—	—
Rideal-Stewart	4,58	—0,04	—0,9
"	4,59	—0,03	—0,6
Winkler	4,61	—	—

Die Abweichungen sind bei den modifizierten Proben im Hinblick auf den *Winkler*-Mittelwert gering, liegen aber leider in derselben Richtung, so daß man annehmen kann, sie seien tatsächlich noch größer: man muß nämlich annehmen, daß den Proben durch die Reagenzien ein gewisses Quantum Sauerstoff zugeführt wurde, und dennoch sind die erhaltenen Werte *zu klein*. Sichtlich besteht hier eine Andeutung desselben Phänomens, das eben nachgewiesen wurde. Nun sollte man glauben, so kleine Fehler seien praktisch bedeutungslos. Es tritt aber ein Umstand hinzu. Ich erwähnte soeben, daß die Sauerstoffaktivierung bei jeder Mangansuperoxydreduktion, im allgemeinen unabhängig von der Beschaffenheit des Reduktionsmittels, eintritt. Daher läßt sich mit gutem Grund annehmen, *daß die Sauerstoffaktivierung mit nachfolgendem Sauerstoffverlust auch bei der Oxydation der reduktionsfähigen Produkte in der Probe eintrifft.* Das ist gleichbedeutend mit der Unanwendbarkeit der Methode, denn es ist natürlich gleichgültig, ob die durch die reduktionsfähigen Produkte bedingten Verluste auf die eine oder andere Weise entstehen. Tatsächlich erhielt ich bei Analysenproben, die mit frischer Milch usw. versetzt und nachher oxydiert worden waren, Werte, die weit unter dem wirklichen Werte lagen. Jedenfalls ist es ausgeschlossen, daß sich die Methode zu einer größeren Kapazität ausarbeiten läßt.

C. Voroxydierungsmethode mit Hypochlorit.

Diese von *Winkler* (1915) ausprobierte Methode leidet an verschiedenen Mängeln; diese treten besonders dann hervor, wenn man größere Quantitäten der Reagenzien anwendet, als *Winkler* vorschrieb, was im allgemeinen notwendig ist, wenn es sich um effektive Oxydation der Verunreinigungen im allgemeinen handelt. Bezüglich dieser Methode will ich auf meine frühere Abhandlung (*Alsterberg*, 1925) hinweisen. Doch will ich in dieser Abhandlung hinzufügen, daß man meiner Er-

fahrung nach genügend kräftige Lösungen erhalten kann, wenn ma Chlorkalk mit Wasser digeriert. Auch bei Reduktion des Überschusse mittels Rhodankaliumzusatz unter besonderen Umständen trete keine Störungen auf. Doch muß der Chlorkalk in diesem Falle *gan frei* von Chlorit sein, wovon man sich nur durch mit reinem Wasse genau ausgeführte Serienexperimente mit gewöhnlichen *Winkler*probe und voroxydierten Proben überzeugen kann, da keine einfachen quali tativen Proben auf Chlorit beim Vorhandensein von Hypochlori existieren. Da Chlorit außerdem in Hypochloritlösungen sehr leich nach einiger Zeit entsteht, kann ich diese Methode nur ausnahmsweis empfehlen.

D. Parallelbehandlung mit Hypochlorit.

Auch diese Methode wurde von *Winkler* (1916) ausgearbeitet Sie besteht darin, daß man eine Hauptprobe und eine Parallelprob mit einer gleich großen Menge Hypochlorit sowie mit Säure versetzt außerdem aber zur Hauptprobe die bei der *Winkler*schen Sauerstoff analyse üblichen Reagenzien hinzugibt. Die Parallelprobe wird dann nur mit KJ versetzt und sofort titriert. Der dabei erhaltene Wert entspricht dem Hypochloritüberschuß und wird vom Wert der Haupt probe subtrahiert. Ich untersuchte das Verfahren nicht näher, abe es ist wahrscheinlich besser als das Manganichloridverfahren. Doch ist die Behandlung paralleler Proben immer umständlich, besonders wenn man geringe Quantitäten konzentrierter Hypochloritlösungen ver wenden will, da selbst unbedeutende Meßfehler das Analysenresultat in sehr störender Weise beeinflussen. Das Reagens muß immer in konzentrierter Form dazugegeben werden, da eine gleiche Menge von Oxydationsmittel in verdünnter Form zugleich eine mit freiem elemen taren Sauerstoff gesättigte oder sogar übersättigte Lösung darstellt, indem Hypochlorit bei Licht unter Entwicklung von freiem Sauerstoff zerfällt. Außerdem treten noch andere Umstände hinzu, die bei der Anwendung der parallelen Chloroxydationstechnik Schwierigkeiten verursachen, worauf ich hier nicht näher einzugehen brauche.

E. Methode mit Auswaschen der Fällung.

Diese allgemein empfohlene Methode stammt ebenfalls von *Winkler* (1914). Sie besteht darin, daß man die Fällung, welche in der nach der *Winkler*schen Methode behandelten Probe entsteht, entweder mit Kohlensäure (*Winkler*, l. c.) oder mit Bicarbonat (*Bruhns, 1915*) behandelt. Die Fällung wird sandig und verliert die Fähigkeit, weiterhin Sauerstoff zu absorbieren, worauf man sie durch Waschen von den die Analyse störenden Verunreinigungen befreien kann. Die Methode, welche ich nicht direkt prüfte, ist mit Rücksicht auf vorkommende

Nitrite und ähnliche Verunreinigungen ausgezeichnet, aber in vielen anderen Fällen nützt sie nichts. Wir erwähnten schon früher, daß die störenden Reaktionen schon im alkalischen Stadium zustande kommen. Einige dieser Reaktionen verlaufen sehr rasch. Beim gleichzeitigen Vorhandensein von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff bildet sich eine Fällung, die durch ihre dunkle Farbe das Vorhandensein von Sauerstoff anzeigt; infolge der reduzierenden Fähigkeit der Sulfide wird aber diese Farbe oft innerhalb weniger Minuten gebleicht. Ebenso verhalten sich schweflige Säure und gewisse Polythionsäuren usw., doch sind diese zuletzt erwähnten Stoffe insofern von geringerer Bedeutung, als sie künstliche Verunreinigungen darstellen, während Schwefelwasserstoff unter rein ökologischen Umständen sehr oft vorkommt. Wir sahen außerdem, daß organische Verunreinigungen auf eine ähnliche Weise stören, wenn auch nicht so energisch wie Schwefelwasserstoff oder schweflige Säure. Deshalb dürfte uns diese Auswaschmethode in den meisten Fällen im Stich lassen.

F. Spezielle Methoden bei Anwesenheit von Eisen.

Eisensalze kommen im natürlichen Wasser sehr oft vor und stören die *Winkler*analyse sehr, was später durch Ziffern veranschaulicht werden soll. Im allgemeinen berücksichtigt man dreiwertiges Eisen (siehe z. B. *Buswell* und *Gallaher*, l. c.). Dieses wirkt im allgemeinen oxydierend auf gleichzeitig vorhandene Jodide, und als Folge davon erhält man einen zu hohen Wert bei der Sauerstoffanalyse. Dem ist aber leicht abzuhelfen, wenn man bei der Lösung der Fällung anstatt Salzsäure Phosphorsäure verwendet, denn Ferriphosphat wirkt sehr schwach oxydierend. Doch stören die zweiwertigen Eisensalze nicht weniger, denn sie wirken als Reduktionsmittel. Teils absorbiert das Ferrooxydhydrat gleich dem Manganooxydhydrat elementaren Sauerstoff, teils wird bei der Lösung der Fällung ein weiteres Quantum noch existierenden zweiwertigen Eisens zu dreiwertigem oxydiert. Die kompensierende Reaktion, wodurch das dreiwertige Eisen durch Oxydation des vorhandenen Jodkaliums in zweiwertige Form übergeführt wird, geht recht langsam vor sich. Kommen zwei- und dreiwertiges Eisen gleichzeitig vor, so besteht nur die Möglichkeit, das ganze Eisen durch Oxydation in Ferrieisen zu verwandeln.

Darum berücksichtigen die vorher genannten Oxydationsvorbehandlungsmethoden, besonders die Chlorierungsmethoden *Winklers*, das Vorkommen von Eisen. Bei Anwesenheit von Eisen in solchen Fällen empfiehlt *Winkler* (1915) die Anwendung von Phosphorsäure. Ab und zu wird in der Literatur beim Vorkommen von Eisen Phosphorsäure oder auch Schwefelsäure als Lösungsmittel empfohlen, ohne

daß man auf die notwendige Voroxydation der Probe hinweist. I
muß zu Fehlern führen, da wenigstens unter natürlichen Verhältnis
damit zu rechnen ist, daß zweiwertiges Eisen in der Probe vorkom

Jedenfalls muß die Probe *beim Vorhandensein von Eisen in je*
Form voroxydiert werden, wenn der Analysenwert sicher sein s

G. Spezielle Analysenmethoden bei Anwesenheit von Nitriten.

Auf dem sauerstoffanalytischen Gebiet hat keine verunreiniger
Substanz so viel Arbeit veranlaßt wie die Nitrite, und die meisten frü
erwähnten Korrektionsmethoden befassen sich mit dieser Form v
Verunreinigung. Außerdem gibt es spezielle Methoden, die ich h
behandeln will. Im übrigen verweise ich auf meine frühere Arb
(*Alsterberg*, 1925).

1. Harnstoffmethode nach Lehmann und Noll. Lehmann (1901) u
Noll (1917) probierten eine Methode aus, die darin besteht, daß d
nitrithaltige Probe mit Harnstoff versetzt wird. Die beiden Sto
reagieren nach der Formel

$$CO(NH_2)_2 + N_2O_3 = CO_2 + 2\,H_2O + 2\,N_2,$$

oder bei gewöhnlicher Temperatur und Überschuß an Harnstoff, w
vom vorliegenden Falle gilt,

$$2\,CO(NH_2)_2 + N_2O_3 = (H_2N)_2CO_3 + CO_2 + 2\,N_2.$$

Doch geht diese Reaktion sehr langsam vor sich, weshalb größe
Möglichkeit für das Vorkommen von Nebenreaktionen vorhanden i
Zur Verdeutlichung führe ich eine Serie von Experimenten an.

Sie umfaßt fünf Partikularserien. Sie wurden demselben Wass
entnommen und mit einer regelrechten *Winkler*analyse ohne fremde Zusät
begonnen und abgeschlossen. Die anderen auf diese Weise gewonnen
Proben der Partikularserie wurden mit Natriumnitritlösung in bestimmte
Quantitäten, 0,5 ccm 50 proz. Harnstofflösung und 0,5 ccm 25 proz. Schwef
säure, versetzt. Einige dieser Proben, die in der Tabelle VI nicht dire
angeführt sind, fungierten als Parallelproben, wenn es sich darum handelt
den Abschluß der Reaktion zu konstatieren (durch Zusatz von KJ un
Stärkelösung) sowie für die Untersuchung der eingetroffenen Veränderunge
im Salpetergehalt. Diesen untersuchte ich durch einen qualitativen Ve
gleich zwischen dem Salpetersäuregehalt der ursprünglichen Nitritlösun
in der Verdünnung, die zustande kam, wenn man Nitritlösung zur Prob
gab, und einer Probe, die man mit Harnstoff die nötige Zeit stehen ließ. B
diesen Analysen wurde das Diphenylaminreagens von *Tillmans* (1910) ve
wendet. In den Vergleichsproben, die die ursprüngliche Nitritlösung enthielten
mußte der Nitritgehalt zuerst entfernt werden, um die Salpetersäureanalys
zu ermöglichen. Diese geschah durch Zusatz von Natriumazid im Überschu
und Schwefelsäure. Der Überschuß an Stickstoffwasserstoffsäure wurd
seinerseits durch Kochen entfernt, bis die Probe ungefähr ein Viertel ode

ein Drittel ihres Volumens verloren hatte[1]), worauf die Probe zu ihrem ursprünglichen Volumen verdünnt wurde und jetzt zur Analyse fertig war. Zwei der mit Nitrit, Harnstoff und Schwefelsäure versetzten Proben wurden nach abgelaufener Reaktionszeit mit den *Winkler*schen Reagenzien versetzt und auf O_2 analysiert (in der Tabelle VI „Nitrit-*Winkler*"). Alle in der Tabelle VI angegebenen Werte sind das Mittel zweier Analysen. Mit Harnstoff versetzte Proben wurden nach 20 Stunden analysiert.

Tabelle VI.

	Methode	Menge Natrium-nitrit	O_2-Menge	Ab-weichung	Ab-weichung	Anmerkungen
		mg pro Probe	ccm pro Liter	ccm pro Liter	Proz.	
A	*Winkler*	0	4,33	—	—	Deutlich erhöhter Salpetersäuregehalt
	Nitrit-*Winkler* . . .	42	0,07	—4,26	—98,4	
B	*Winkler*	0	4,91	—	—	
	Nitrit-*Winkler* . . .	21	2,79	—2,12	—43,2	
C	*Winkler*	0	4,79	—	—	
	Nitrit-*Winkler* . . .	10,5	3,63	—1,16	—24,2	
D	*Winkler*	0	4,73	—	—	Salpetersäuregehalt nicht deutlich erhöht
	Nitrit-*Winkler* . . .	5,25	4,62	—0,11	— 2,3	
E	*Winkler*	0	4,65	—	—	
	Nitrit-*Winkler* . . .	2,63	4,63	—0,02	— 0,4	

Die Zusammenfassung der Resultate ergibt, daß sich die Destruktion auch geringer Nitritquantitäten durch Harnstoff nicht leicht durchführen läßt, ohne daß gleichzeitig der im Wasser gelöste elementare Sauerstoff verschwindet und damit der Zweck der Behandlung verfehlt ist. Im Partialexperiment A wurde nur ein Bruchteil des anfangs vorhandenen Sauerstoffs in der Analyse konstatiert. Noch im Partialexperiment D war die Differenz größer als 2 Proz. Wohin kommt nun dieser verschwindende Sauerstoff? Diese Frage läßt sich leicht beantworten, denn ***der Sauerstoff verursacht eine Erhöhung des Nitratgehalts.*** Der hinzugefügte Harnstoff spielt keine Rolle, denn ich konstatierte,

[1]) Die Stickstoffwasserstoffsäure ist sehr flüchtig. Nichtsdestoweniger muß man die Probe bei größerem Flüssigkeitsvolumen kochen, um sie zu entfernen, was unbedingt notwendig ist, weil sie durch ihre Gegenwart die Salpetersäurereaktion schwächt oder verhindert. Handelt es sich um geringe Flüssigkeitsmengen, so untersucht man am besten auf Stickstoffwasserstoffsäure, indem man beim Kochen der Probe einen mit neutralem Eisenchlorid getränkten Filtrierpapierstreifen vor die Mündung des Proberöhrchens hält: ***momentan*** auftretende Rotfärbung bezeichnet das Vorkommen von Stickstoffwasserstoffsäure (*Alsterberg*, 1924b). Doch muß ich darauf hinweisen, daß eine Dunkelfärbung nach der ***Erwärmung*** des Papiers nur auf einer bei höherer Temperatur stärker auftretenden Hydrolyse des Eisenchlorids beruht, während die Stickstoffwasserstoffsäure in diesem Falle verdunstet, ohne das Papier zu färben.

daß diese Substanz auch in großen Mengen auf die Resultate
*Winkler*analyse keinen Einfluß ausübt. Das geht auch aus den Re
taten der späteren Partialserien in dem eben referierten Experim
hervor. Auch über den näheren Verlauf kann man sich mit einer
wissen Bestimmtheit aussprechen. Beim Destruktionsprozeß zwisc
Nitrit und Harnstoff bildet sich eine Menge *sehr kleiner* aufsteigen
Gasblasen, sie bilden eine große Oberfläche, durch welche die salpetı
Säure und Sauerstoff aus dem Wasser diffundieren. Diese reagie
aufeinander nach der Formel

$$2\,N_2O_3 + O_2 = 2\,N_2O_4,$$

worauf die so gebildete Untersalpetersäure im Wasser in salpetr
Säure und *Salpetersäure* zerfällt.

$$N_2O_4 + H_2O = HNO_2 + HNO_3.$$

Dieser Kreislauf kann weitergehen, bis das ganze Nitrit zu Salpet
säure verarbeitet oder bis der ganze Sauerstoff verschwunden i
Hier ist die Zeit ein wichtiges Moment, und da der Zerfallsproz
zwischen salpetriger Säure und Harnstoff so außerordentlich langsa
vor sich geht, können diese Umstände eine bedeutende Rolle spiel

Der Versuch zeigt im Hinblick auf die O_2-analytische Techni
daß das *Lehmann*sche Verfahren gänzlich ungeeignet ist, wenn es si
um die Entfernung größerer Nitritmengen handelt. Erst bei niedrigere
Nitritgehalt sind bessere Resultate zu erzielen.

Noll (l. c.) experimentierte mit derselben Methode, und sei
Resultate sind durchweg gute, aber die von ihm angewendeten Nitr
mengen sind im allgemeinen geringer als meine. Allerdings versetz
er jede Probe mit 1 ccm 50proz. Harnstoff und 1 ccm 25proz. Schwef
säure, während ich nur 0,5 ccm von jedem Reagens dazu gab, w
meine Probeflaschen viel kleiner waren.

Hier mag erwähnt werden, daß die konstatierten Tatsachen nic
ohne Bedeutung sind, wenn es sich um die Analyse der Nitrite handel
Wir sahen, daß der Nitritgehalt in den Proben bei der Harnstof
behandlung *stieg*, was in offenen Proben in noch höherem Grade stat
fand. Daher ist Harnstoff nicht als Destruktionsmittel für Nitri
geeignet, wenn es sich um die separate Analyse von Nitraten bei A
wesenheit von Nitriten handelt. Hierfür erwies sich die Stickstof
wasserstoffsäure und ihre Salze als weitaus besser (*Sommer* und *Pinca*
1915; *Alsterberg*, 1924b).

2. *Neutralisationsmethoden nach Clarke, Hale und Melia.* Bezüglic
dieser Methoden verweise ich auf meine Abhandlung (*Alsterberg*, 1925
Die Methode *Clarkes* hat *Noll* (1917) recht scharf und wahrscheinlic
richtig kritisiert. Die Methode *Hales* und *Melias* (1913) kontrolliert

ich durch eigene Experimente und fand sie sehr gut, wenn es sich darum handelt, *die Nitrite als katalysatorisch störende Substanzen auszuschließen*. Doch besteht eine Fehlerquelle im Analysenresultat darin, daß es durch den Sauerstoff erhöht wird, den die Nitrite bei ihrem Übergang in Stickstoffoxyd abgeben.

3. Die Azidmethoden. Bezüglich dieser von mir ausgearbeiteten Methoden verweise ich auf meine Abhandlung (*Alsterberg*, 1925). Durch diese Methoden lassen sich vorhandene Nitrite leicht entfernen. Doch können nur geringe Nitritmengen auf diese Weise entfernt werden. Ich fand, daß man jede Probe (125 ccm) mit 10 mg NaN_3 versetzen kann, ohne dem Analysenresultat im geringsten zu schaden. Diese Dosis genügt, um Störungen einer Nitritkonzentration von etwa 25 mg pro Liter (berechnet als $NaNO_2$) zu entfernen. Handelt es sich um die Entfernung größerer Nitritmengen, so muß man zu anderen Methoden greifen.

H. Romijns Methode.

Romijns Methode (1896) ist eigentlich nur eine Modifizierung der nicht modifizierten *Winkler*schen Analysenmethode mit besonderer Berücksichtigung eines von *Romijn* konstruierten Probeentnahmegefäßes, das die Form einer Pipette hat und oben und unten durch Hähne verschlossen ist. Die bei der gewöhnlichen *Winkler*methodik entstehende Fällung bildet ein Hindernis für die Anwendung des Apparats. Die Entstehung einer solchen Fällung wird dadurch verhindert, daß man nach der Manganchlorürdosis Seignettesalz zur Probe gibt; beim Laugenzusatz entsteht keine Fällung in der Probe, sondern die ganze Flüssigkeit wirkt O_2-absorbierend. Doch erhält man (*Jorissen* und *Ringer*, 1905; *van Eck*, 1913; *Schoorl*, 1913) bei dieser Methode leicht fehlerhafte Werte, z. B. wenn Kalk oder Magnesia vorhanden ist, weshalb die Methode unbrauchbar ist.

III. Eine neue Korrektionsmethode mittels Voroxydierung durch Brom.

Wenn es sich darum handelt, die Störungen reduzierender Stoffe sämtlich auszuschalten, so erfüllen die referierten Korrektionsmethoden diese Forderung nicht. Die Parallelbehandlungen sind immer mehr oder weniger kompliziert und doch durchaus nicht sicher; das Manganichloridverfahren ist ganz unbrauchbar, die Parallelbehandlung mit Chlor ist besser, doch riskiert man hier Fehler, die mit Rücksicht auf das Analysenresultat recht hoch sind. Eine Vorbehandlungsmethodik ist absolut vorzuziehen, aber die dafür ausprobierten Methoden sind unsicher. Das Verfahren von *Rideal* und *Stewart* (1901) muß ganz einfach immer mehr oder weniger fehlerhafte Resultate erzielen, wie meine Experimente nachweisen, und *Winklers* Chlor-Rhodanmethode (1915) hat den Nachteil, daß sich der Reinheitsgrad des Chlorkalks nicht durch einfache Experimente bestimmen läßt. Die Auswaschmethode erzielt in gewissen Fällen gute Resultate, ist aber in anderen

nutzlos. Die Methoden, welche besonders die Nitrite berücksichtigen spielen nur eine spezielle Rolle. Darum war es notwendig, eine Korrektionsmethode auszuprobieren, die sich zum allgemeinen Gebrauch eignete. Die O_2-Analysenmethode *Winklers* ist wegen des Wechsel neutrale → alkalische → saure Reaktion höchst empfindlich und läßt sich nicht in allen Fällen anwenden. Doch läßt sich ihre allgemeine Brauchbarkeit erhöhen, wenn man sie mit ausgearbeiteten Korrektionsverfahren kombiniert. Ich will jetzt eine neue Voroxydierungsmethode darlegen, deren Brauchbarkeit ich außerdem in einer Reihe von Fällen untersuchte.

A. Voroxydierungstechnik mit freiem Brom.

1. Die allgemeinen Prinzipien der Voroxydierungstechnik mit Brom. Meine Methode besteht hauptsächlich darin, daß die Wasserprobe, welche einer O_2-Analyse unterworfen werden soll, zuerst mit freiem Brom oxydiert wird. Brom ist ein recht starkes Oxydationsmittel, das die meisten reduzierenden Stoffe, welche die *Winkler*sche Analyse stören, angreift. Ferner kann freies Brom quantitativ salpetrige Säure zu Salpetersäure oxydieren; seiner Wirkung nach gleicht es am meisten freiem Chlor. Der Bromüberschuß wird durch einen Zusatz von Salicylsäure reduziert. Dieser gegenüber sowie gegenüber den Phenolen und Phenolderivaten wirkt das Brom substituierend, indem es z. B. mit Salicylsäure, wenn diese im Überschuß vorhanden ist Tribromsalicylsäure bildet:

$$C_6H_4(OH)COOH + 3\,Br_2 = C_6HBr_3(OH)COOH + 3\,HBr.$$

Tribromsalicylsäure wirkt auf Jodkalium nicht oxydierend, weshalb eine so behandelte Probe nachher nach der *Winkler*methode auf Sauerstoff analysiert werden kann. Ich versuchte, andere Phenolderivate zu verwenden, besonders Phenol, das sich leichter als Salicylsäure hinzugeben läßt, konstatierte aber in den darauffolgenden Analysen große O_2-Verluste.

Auch die Salicylsäure ist nicht ganz ohne Einfluß auf die folgenden Stadien der O_2-Analyse, aber diese Einwirkung ist durch einen genügenden Zusatz von KJ leicht zu eliminieren. Auf freies Jod in saurer Lösung ist reine Salicylsäure ohne Wirkung, wogegen diese Substanz in alkalischer Lösung stark substituierend wirkt.

2. Die zur Voroxydation nötigen Reagenzien. Die zur Bromvoroxydierung notwendigen Reagenzien sind: Bromlösung und eine Lösung von Natriumsalicylat. Ferner benutzte ich bei Verwendung dieser Technik immer Phosphorsäure zum Ansäuern der Probe.

Die Bromlösung kann auf verschiedene Weise zubereitet werden. Meistens gab ich etwa 9 g freies Brom (= 3 ccm, mit Rohrpipette

gemessen), 6 g KBr, in ein wenig Wasser gelöst und 10 ccm 25proz. HCl in einen 100-ccm-Meßkolben, worauf die Zusätze geschüttelt wurden, bis das Brom aufgelöst war. Daraufhin gab ich Aqua dest. dazu, so daß 100 ccm Lösung entstanden. Die ungefähr n/1 Lösung ist recht haltbar, wenn man sie in einer braunen Flasche mit Glasstöpsel aufbewahrt (geschützt vor Licht), nimmt jedoch nach und nach an Stärke ab. Das Brom oxydiert das Wasser, wobei sich freier Sauerstoff und Bromwasserstoff bilden, weshalb man nach einer gewissen Zeit eine neue Lösung zubereiten muß, je nach den Forderungen, die man an die Stärke der Lösung stellt. Man stellt sie am leichtesten fest, indem man nach einem genügenden KJ-Zusatz zu einer abgemessenen Quantität Lösung in etwa 50 bis 100 ccm Wasser mit einer bekannten Hyposulfitlösung titriert. Die Pipettierung des freien Broms bei der Zubereitung der Lösung ist recht unangenehm; diese Schwierigkeit vermeidet man aber, wenn man von Kaliumbromat ausgeht. Man löst 20 g NaBr in 20 ccm kaltem Wasser in einem 100-ccm-Meßkolben, versetzt die Lösung mit 3 g $KBrO_3$ und, ohne dessen Auflösung abzuwarten, nach und nach mit 25 ccm 25proz. HCl, wobei man die Lösung unter der Wasserleitung abkühlt, um ihre Erwärmung während der Reaktion zu verhindern. Jetzt entsteht eine Lösung von freiem Brom, sobald sich das Bromat löst; um das frei gemachte Brom zur Auflösung zu bringen, muß man die Flüssigkeit schütteln. Ist die ganze Säure zugeführt und hat sich das Bromat gelöst, so verdünnt man mit Aqua dest. zu 100 ccm-Lösung, worauf das Reagens fertig ist. Ich glaube, daß sich Natriumbromat leichter verwenden läßt als das entsprechende Kaliumsalz, weil das Natriumsalz leicht löslich ist. Doch konnte ich dies nicht prüfen.

Salicylsäure wurde in Form von Natriumsalicylat verwendet, weil diese Verbindung leicht löslich ist; die Säure als solche ist dagegen recht schwer löslich. Dieses Reagens wird bereitet, indem man 10 g Salicylsäure in einem Becherglas abwägt und 10 bis 20 ccm Wasser und 20 ccm 15proz. Natronlauge (aus ganz reiner Substanz bereitet) dazugibt, worauf sich die Säure recht rasch löst. Nachdem sie sich ganz oder fast ganz gelöst hat, gibt man Aqua dest. dazu, so daß 100 ccm Lösung entstehen. Das Reagens hält sich bei dieser Konzentration lange Zeit, nimmt aber nach und nach eine gelbe bis schwach braungelbe Farbe an, was gar nichts bedeutet. Wird das Präparat aber sepiabraun, was nur in konzentrierten Lösungen gewöhnlich sehr rasch eintritt, so muß es erneuert werden. Die Lösung ist in einer mit Glasstöpsel versehenen Flasche aufzubewahren.

Als Lösungsmittel für die Fällung verwendete ich konsequent sirupöse Phosphorsäure (85proz.). In den meisten Fällen läßt sich Salz- oder Schwefelsäure verwenden. Wenn aber Eisensalze in der

Probe vorhanden sind, muß man aus mehreren Gründen Phosphorsäu
verwenden.

3. Behandlung der Analysenprobe bei Anwendung der Vorox dierungsmethode mittels Brom. Man muß die Probe in gleich Weise und mit denselben Flaschen entnehmen, wie ich es früh empfohlen habe. Danach gibt man unmittelbar 0,5 ccm mit der Me pipette entnommene Bromlösung hinzu, worauf man den Stöps einsetzt und die Probe schüttelt, die man dann etwa 24 Stunden steh läßt. Unmittelbar vor der Analyse erfolgt die weitere Behandlu der Probe. Nachdem man die eventuell vorhandene Flüssigkeit zwisch Stöpsel und Hals der Flasche entfernt hat, nimmt man den Stöps heraus und gibt sofort 0,5 ccm Natriumsalicylatlösung hinzu. Hernac setzt man den Stöpsel wieder ein, ohne daß irgend eine Luftblase vo handen sein darf, worauf die Probe alsdann geschüttelt wird. D Probe muß sich nun sogleich vollständig klären oder durch die au geschiedene bromierte Salicylsäure höchstens etwas trübe sein. Wichti ist, daß man die Probe unmittelbar nach dem Salicylsäurezusat schüttelt, denn sonst wird die bromierte Salicylsäure in großen Flocke ausgeschieden; in diesem Falle wird der oxydierende Bromzusatz nich ganz reduziert, sondern es bleiben Spuren davon zurück, möglicher weise deshalb, weil in der großflockigen Fällung der bromierten Salicyl säure Tribromsalicylsäurebromid eingeschlossen ist, das bei der Reaktio des überschüssigen Broms auf Salicylsäure entsteht. Diese Verbindun wirkt oxydierend auf Jodkalium.

Durch das sofortige Schütteln der Probe nach dem Salicylsäure zusatz wird die immer unmittelbar entstehende Trübung aufgelöst un die Salicylsäure wirkt überall im Überschuß. Ich überzeugte mich auch durch Experimente, daß nicht bromierte Salicylsäure Tetrabrom derivate reduzieren kann.

Hat die Probe 15 Minuten gestanden, so öffnet man die Flasche wieder, worauf die *Winkler*schen Reagenzien (1 ccm Manganchlorür und 1 ccm KJ-haltige Natronlauge) dazugegeben werden, worauf man die Probe schüttelt. Die entstehende Fällung ist sehr voluminös und sinkt nie so vollständig in sich zusammen, wie dies sonst der Fall ist. Das beruht sichtlich auf der vorhandenen Salicylsäure; diese bedingt auch eine stärkere Braunfärbung. Doch ist die Lösung oberhalb der Fällung immer ganz klar, während sie bei der gewöhnlichen *Winkler*analyse oft recht trübe ist.

Nach dem Zusatz der *Winkler*reagenzien wartet man 10 bis 15 Minuten (die Fällung nimmt da die Hälfte der Flasche ein) und gibt dann die Säure dazu. Auf Grund der voluminösen Beschaffenheit der Fällung muß man hier vorsichtig vorgehen, da die Fällung sonst leicht aufgewirbelt wird; hat man den Stöpsel herausgenommen, so

taucht man die Pipette in die Flasche und läßt erst dann die Säure ausfließen, wenn die Pipettenspitze den Boden der Flasche erreicht hat. Ist der größte Teil der Säure ausgeflossen, so zieht man die Pipette langsam heraus, wobei die restliche Säure ausfließt, ohne die Fällung im mindesten aufzuwirbeln. Dann verschließt und schüttelt man die Flasche, bis sich die Fällung aufgelöst hat, worauf die Lösung klar oder, wegen der ausgeschiedenen Salicylsäureverbindungen, trübe ist. Am besten ist es, 1 ccm sirupöse Phosphorsäure zur Probe zu geben; auch muß die Pipettenmündung weit und die Pipette im übrigen nicht zu eng sein, da Phosphorsäure in dieser Konzentration schwerflüssig ist. Zieht man Schwefelsäure vor, so genügen 2 ccm 50proz. Schwefelsäure. Bezüglich der Säure kann man sich schon während der Vorbehandlung entscheiden; die Entscheidung hängt davon ab, ob Eisen vorhanden ist oder nicht. Existiert Eisen, so färbt sich die Probe beim Salicylzusatz mehr oder weniger deutlich lila, beim Vorkommen einer größeren Menge von Eisen so stark, daß die Phosphorsäure schon deshalb bei der Lösung der Fällung notwendig ist, weil man den Umschlag bei der Titration sonst nicht wahrnehmen könnte. Phosphorsäure besitzt nämlich die Eigenschaft, die Farbe vieler Eisenverbindungen zu bleichen. So verschwindet z. B. bei Monokaliumphosphatzusatz die braune Farbe des Eisenchlorids und die rote Farbe der Ferrirhodanide, und dasselbe gilt von den stark gefärbten Ferriverbindungen mit verschiedenen Phenolderivaten.

Danach ist die Probe zur gewöhnlichen Titration fertig.

Doch muß ich noch einiges hinzufügen. Der Verschluß der Probeflaschen nach kleineren Reagenzzusätzen, wobei die Flüssigkeit nicht den ganzen Hals der Flasche ausfüllt, erfordert eine gewisse Geschicklichkeit, da sonst leicht eine Luftblase zurückbleiben kann. Dem entgeht man leicht, wenn man den Stöpsel beim Verschließen der Flasche rasch hineinschiebt. Steht die Probe länger als 24 Stunden, so muß man immer einige Vorsichtsmaßnahmen treffen, um zu verhindern, daß Luft in die Flasche gesaugt wird; das geschieht nämlich sehr leicht trotz guter Stöpsel, weil die Flüssigkeit auf Grund einer Kapillaraufsaugung der Flüssigkeit zwischen Stöpsel und Flaschenhals einer geringen Verdunstung ausgesetzt ist. Um das zu verhindern, muß man immer darauf achten, daß der Zwischenraum zwischen dem Stöpselkopf und dem oberen Rand des Flaschenhalses mit Wasser gefüllt ist. Das erreicht man am besten dadurch, daß man die Flasche gleich nach dem Schütteln unter einen Wasserstrahl hält, der den Stöpselkopf trifft; das Wasser fließt daran herunter und pflegt den Zwischenraum vollständig auszufüllen.

4. *Experimentelle Resultate, die zeigen, daß die zur Bromoxydation notwendigen Reagenzien nicht störend auf die Analyse einwirken.* Natürlich

mußte ich mich durch blinde Proben von der Verwendbarkeit de Methode überzeugen. Ich gebe hier eine Serie wieder, die diesen Vorgan illustriert.

Sie bestand aus sechs Proben, die alle demselben Wasser (durchlüftete destilliertes Wasser) entnommen waren. Die eine Hälfte wurde nach de gewöhnlichen *Winkler*methode behandelt, wobei Schwefelsäure als Lösungs mittel zur Verwendung gelangte. Die andere Hälfte wurde nach der Brom oxydationstechnik behandelt.

Tabelle VII.

Methode	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Bromoxydation	5,30	+ 0,01	+ 0,2
Winkler	5,30	—	—
Bromoxydation	5,30	+ 0,01	+ 0,2
Winkler	5,28	—	—
Bromoxydation	5,30	+ 0,01	+ 0,2
Winkler	5,29	—	—

Die hier wiedergegebene Serie bestätigt die Brauchbarkeit de neuen Vorbehandlungsmethode zur Genüge. Ich muß aber auf da schärfste betonen, wie wichtig das Vorhandensein einer genügende KJ-Menge in der Probe ist, da sonst die hinzugefügte Salicylsäure bei der Lösung der Fällung leicht von der oxydierten Manganfällun angegriffen wird.

Nun könnte man allerdings fürchten, daß die neue Methode bein Vorhandensein höherer O_2-Gehalte versagen sollte. Mit Rücksicht au die Salicylsäure ließe sich vermuten, daß eine größere Mangansuper oxydquantität, die ja aus einem hohen O_2-Gehalt resultiert, auf di Salicylsäure irgendwie oxydierend wirken könnte. Daß dies nicht de Fall ist, geht aus den Zahlen eines Experiments hervor, das nach den selben Prinzipien wie das eben besprochene angeordnet war, doc bestand der Unterschied darin, daß das Probewasser infolge Durch lüftung mit freiem Sauerstoff sehr O_2-reich war.

Tabelle VIII.

Methode	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	19,80	—	—
Bromoxydation . . .	19,75	± 0,0	± 0,0
Winkler	19,76	—	—
Bromoxydation . . .	19,73	— 0,02	— 0,1
Winkler	19,70	—	—
Bromoxydation . . .	19,73	— 0,02	— 0,1

Aus den Werten geht mit aller Deutlichkeit hervor, daß das be höheren O_2-Konzentrationen befürchtete Defizit nicht zustande kommt

B. Anwendung der Bromoxydationstechnik beim Vorhandensein von Eisen.

1. *Vorhandensein von Ferroverbindungen.* Zweiwertiges Eisen kommt, wiewohl in geringen Mengen, im Wasser sehr oft vor. Im allgemeinen legte man ihm als störende Substanz nur wenig Bedeutung bei und berücksichtigte von diesem Gesichtspunkt aus nur dreiwertiges Eisen. *Bruhns* betonte (1916) als einziger die Bedeutung der Ferroverbindungen als störender Substanzen, erklärte aber gleichzeitig für unmöglich, eine einfache Sauerstoffanalysenmethode für Wasser, das auf solche Weise verunreinigt ist, zu finden.

Um die Bedeutung der Ferroverbindungen zu demonstrieren, will ich eine Versuchsreihe anführen. Sie bestand aus 12 Proben, unmittelbar nacheinander demselben Wasser (durchlüftetes destilliertes Wasser) entnommen. Drei Proben waren gewöhnliche *Winkler*analysen, und bei der Schlußanalyse wurde 50proz. H_2SO_4 verwendet; drei Proben wurden in derselben Weise behandelt, aber außerdem mit je 1 ccm Ferrosalzlösung versetzt, die aus 3,5 g *Mohrs* Salz (Ferroammoniumsulfat) auf 100 ccm Lösung (1 ccm = 5 mg Ferroeisen) bestand; ferner wurden drei Proben ebenso behandelt, aber in Phosphorsäure aufgelöst. Die letzten drei Proben, ebenfalls mit Eisen versetzt, wurden nach meiner Bromoxydationsmethode behandelt. Das Resultat der Analysen veranschaulicht Tabelle IX.

Tabelle IX.

Methode	Ferroeisenzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,23	—	—
„	5	„	1,49	— 3,74	— 71,5
„	5	H_3PO_4	1,42	— 3,81	— 72,8
Bromoxydation	5	„	5,24	+ 0,01	+ 0,2

Bei der Ausrechnung der Resultate korrigierte ich die Flüssigkeitsvolumina, indem ich das Volumen der hinzugefügten Ferroeisenlösung subtrahierte, da sich nicht annehmen läßt, daß sie freien Sauerstoff enthalten kann, weil die Lösung sehr bald durch eine bräunliche Fällung — sichtlich O_2-absorbierendes Ferrooxydhydrat — getrübt wurde.

Die Ziffern enthüllen mehrere überraschende Tatsachen. Das zweiwertige Eisen verwandelt sich während der Analyse auf Kosten des vorhandenen elementaren Sauerstoffs in dreiwertiges und deshalb werden die Analysenresultate nach der nicht modifizierten *Winkler*-methode zu niedrig. Allerdings wirkt das so entstandene dreiwertige Eisen oxydierend auf das vorhandene Jodkalium, aber dieser Prozeß geht so langsam vor sich, daß das einzige Resultat ein schlechter Umschlag bei der Titrierung ist. Dieser rückläufige Prozeß ist bei mit Phosphorsäure behandelten Proben ganz ausgeschlossen, und deshalb erscheint der O_2-Verlust in Analysen nach der auf diese Weise modifizierten

*Winkler*methode beim Vorhandensein von Ferroeisen am meisten ausgeprägt. In den Proben nach der Bromoxydationsmethode stimmen die Werte nahezu vollständig mit den *Winkler*-O_2-Werten der Proben ohne Eisen *überein*, und damit ist der Beweis für die Anwendbarkeit der Methode in diesem Falle erbracht.

Tatsächlich ist man erstaunt darüber, daß eine so geringe Ferromenge die Analyse so zu stören vermag, denn wiewohl der absolute O_2-Gehalt des Wassers keineswegs niedrig war, gingen doch ungefähr 72 Proz. des Totalwertes (= 3,8 ccm pro Liter) verloren. Bei einer Berechnung stellt sich der Ferrogehalt in diesem Falle sehr hoch (5 mg pro Probe = etwa 40 mg pro Liter), weshalb man unter natürlichen Verhältnissen nicht mit solchen Störungen rechnen kann. Die Ferroeisenmenge beläuft sich pro Liter höchstens auf ungefähr 5 mg (vgl. z. B. *Schreiber*, 1906; *Knauthe*, 1907, S. 25, 35; *Sondén*, 1914, S. 9, 11, 31, 35 usw.); verschwindet aber der freie Sauerstoff oder wird das Wasser stark sauer, so kann die Ferrokonzentration natürlich bedeutend sein. Nun greift auch eine Konzentration von 5 mg Ferroeisen sehr störend in die Analyse ein, was durch eine einfache Berechnung veranschaulicht werden kann: im oben angeführten Experiment absorbierten 40 mg Ferroeisen ungefähr 3,8 ccm O_2, folglich müssen 5 mg pro Liter, bei der oben erwähnten O_2-Konzentration 0,4 bis 0,5 ccm (= 8 — 10 Proz.) absorbieren, ein sehr bedeutender Fehler.

2. *Vorhandensein von Ferriverbindungen.* Aus dem vorhergehenden Analysenresultat läßt sich leicht antizipieren, welches Resultat mit Rücksicht auf etwa vorhandenes dreiwertiges Eisen zustande kommt. Doch möchte ich hier besonders mit Rücksicht auf den störenden Einfluß, den die Ferrisalze auf die nicht modifizierte *Winkler*methode ausüben, eine tabellarisch geordnete Serie anführen.

Sie wurde nach denselben Prinzipien wie die vorhergehende Serie ausgeführt. Nur wurde dort, wo ich früher Ferrosalze dazugegeben hatte, Ferrisalz in Form einer Ferriammoniumsulfatlösung (4,3 g Ferriammoniumsulfat *pro analysi Merck* auf 100 ccm Lösung) hinzugefügt. Von dieser Lösung gab ich zu jeder Probe 1 ccm (= 5 mg Ferrieisen).

Tabelle X.

Methode	Ferrieisenzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,16	—	—
„	5	„	5,16	± 0,0	± 0,0
„	5	H_3PO_4	5,11	— 0,05	— 1,0
Bromoxydierung	5	„	5,16	± 0,0	± 0,0

Bei der Ausrechnung der Resultate verfuhr ich bei der Korrigierung des Flüssigkeitsvolumens in der Weise, daß ich das Volumen der zu-

geführten Ferrieisenlösung nicht subtrahierte. In diesem Falle muß der Sauerstoff zurückgeblieben sein, da die Salzkonzentration nicht besonders hoch war; auch eine chemische Veränderung kann der Sauerstoff in diesem Falle kaum erleiden. Vergleichen wir die verschiedenen Werte, so finden wir die überraschende Tatsache, daß die Werte nach der nicht modifizierten *Winkler*analyse hier bei Verwendung von H_2SO_4 nicht viel höher werden, obwohl Ferrieisen Jodwasserstoff oxydieren kann; sichtlich verläuft diese Oxydierung so langsam, daß sie zunächst einen schlecht markierten Umschlag bei den Titrierungen zur Folge hat. Die Werte der nach *Winkler* mit Phosphorsäure als Lösungsmittel behandelten Proben sind fast ganz richtig, doch etwas zu niedrig, was auf einer geringen Verunreinigung des Ferrosalzes beim Ferropräparat beruht.. Dagegen ergeben die nach der Voroxydierungstechnik behandelten Proben ganz korrekte Werte.

Als allgemeines Resultat der angeführten Serien mag bezüglich der O_2-Analyse eisenhaltigen Wassers gesagt werden, daß die *Winkler*methode, sowohl in nicht modifizierter Form als auch in den Fällen, wo Phosphorsäure zur Lösung der Fällung verwendet wird, zu sehr unsicheren Resultaten führt. Dagegen ergibt die Bromoxydierungsmethode immer zuverlässige Werte. Bei natürlichen Verhältnissen dürfte der Eisengehalt oft ein so bedeutender Faktor sein, daß eine Bromoxydierung dazu beiträgt, das Resultat sicherer zu machen. Da man mit Rücksicht auf den elementaren Sauerstoff und auf die Eisenverbindungen vom physiologischen Gesichtspunkt aus mit sehr bedeutenden Faktoren zu tun hat, dürften auch oft experimentelle Verhältnisse vorkommen, wo die mitgeteilte Bromoxydierungstechnik als analytische Methode von hohem Wert sein muß.

C. *Vorkommen von oxydierbaren organischen Schwefelverbindungen.*

1. Vorkommen von H_2S. Schwefelwasserstoff kommt in der Natur sehr häufig vor, öfter als man gewöhnlich annimmt. Er tritt besonders bei künstlicher Verunreinigung auf, kommt aber regelmäßig in Seen vor, meistens aber nur in der Nähe des Grundes; tatsächlich ist die H_2S-Produktion in bestimmtem Süßwasser zu gewissen Zeiten eine ebenso regelmäßige Erscheinung wie die von Sauerstoff zu anderen Zeiten (siehe *Sundins* und *Henningssons* Tabellen, 1912). Diese Substanz ist direkt und indirekt von größter Bedeutung, denn teils ist sie ein starkes Fischgift (*König* und *Haselhoff*, 1897; *Weigelt*, 1900; *Knauthe*, 1907), teils bildet sie ein starkes Reduktionsmittel, das die gleichzeitige Anwesenheit von freiem Sauerstoff unter bestimmten ökologischen Umständen unmöglich machen dürfte, was darauf beruht, daß die H_2S-oxydierenden Mikroorganismen ein Hindernis bilden (*Alsterberg*, 1922, S. 18). Dagegen

hält sich H_2S auch in O_2-reichem Wasser lange, wenn das hinzu gefügte H_2S im Laboratorium hergestellt ist, denn dann ist das Vor kommen von H_2S-destruierenden Organismen ausgeschlossen.

Doch gibt es einige sehr interessante Mitteilungen über gleich zeitiges Vorkommen von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff im Wasse unter ganz natürlichen Verhältnissen. *Lebedinzew* (1905) bringt Ziffern die hier von Interesse sind, weshalb ich eine tabellarische Zusammen stellung seiner Untersuchungen über O_2- und H_2S-Gehalt im Mofjor bei Bergen teilweise referiere. Er bestimmte hier den Schwefelwasser stoffgehalt kolorimetrisch mit Nitroprussidnatrium.

Tabelle XI.

Tiefe m	Sauerstoff ccm pro Liter	Schwefelwasserstoff mg pro Liter	Tiefe m	Sauerstoff ccm pro Liter	Schwefelwasserstoff mg pro Liter
0	7,90	—	50	0,86	—
10	7,40	—	60	1,40	0,02
20	5,10	—	100	0,24	0,52
30	4,00	—	200	0,22—0,17	1,36
40	2,43	—			

Ich will noch eine Serie aus *Sondéns* Untersuchungen (1912, S. 75 über die chemischen Verhältnisse in verschiedenem Wasser in der Näh von Stockholm anführen. *Sondéns* Sauerstoffwerte wurden nach der nich modifizierten *Winkler*methode bestimmt, die H_2S-Werte mittels Jod titrierung.

Tabelle XII.

Tiefe m	Sauerstoff ccm pro Liter	Schwefelwasserstoff mg pro Liter	Tiefe m	Sauerstoff ccm pro Liter	Schwefelwasserstoff mg pro Liter
0	8,5	—	11	0,1	0,8
5	8,6	—	12	—	1,6
10	0,6	—	13	—	2,0

Diese Angabe kann jedoch insofern zweifelhaft sein, als es viel andere Substanzen außer H_2S gibt, die auf Jod reduzierend wirke (vgl. *Birge* und *Juday*, 1911, S. 103).

Sehr interessant sind die von *Jonsson* mitgeteilten Angaben (1921 der darauf hinweist, daß er manchmal sehr deutliche Schwefelwasser stoffreaktionen erhielt (bei Verwendung von Amidodimethylanilinsulfa = *Caros* Reagens), obwohl gleichzeitig Sauerstoff vorhanden wa Auch gab es in den von ihm mitgeteilten Tabellen mehrere Fälle, w H_2S, bestimmt durch Jod, gleichzeitig mit Sauerstoff vorkam.

Sondén fügt aber (1912, S. 12, Anm.) hinzu, daß er nicht gut versteht wie in derselben Wasserprobe meßbare Quantitäten Sauerstoff un

Schwefelwasserstoff vorkommen können. Tatsächlich stört ein gleichzeitiges Vorkommen von H_2S die O_2-Analyse derart, daß sie beinahe unmöglich ist; man erhält als Analysenwert ungefähr den Unterschied zwischen dem O_2-Gehalt und dem H_2S-Gehalt. Damit lassen sich die Ziffern in den früher mitgeteilten Tabellen sehr leicht erklären, denn der Sauerstoff war *im Überschuß* vorhanden; der vorhandene Sauerstoff stört dagegen eine H_2S-Analyse an und für sich nicht.

Als ich die Verwendbarkeit der Bromoxydierungstechnik zur Entfernung von vorhandenem Schwefelwasserstoff untersuchte, machte ich zahlreiche Experimente nach der neuen Methode, von denen ich hier eine Serie anführen will.

Alle hierher gehörigen Proben wurden unmittelbar nacheinander demselben Wasser (durchlüftetem, destilliertem Wasser) entnommen. Drei Proben wurden nach *Winkler* ohne fremde Zusätze behandelt. Drei andere Proben wurden nach der *Winkler*methode analysiert, aber vor Zusatz der übrigen Reagenzien mit 0,5 ccm H_2S-Wasser (= 1,4 mg H_2S nach durchgeführter Jodtitrierung) versetzt. Endlich wurden drei ebenfalls mit H_2S versetzte Proben nach der Bromoxydierungstechnik analysiert. Bezüglich der Einwirkungszeit ist darauf hinzuweisen, daß das Brom den Schwefelwasserstoff nicht unmittelbar zu Schwefelsäure oxydiert, sondern daß sich zuerst Polythionsäuren bilden, die, wie in einem anderen Zusammenhang nachgewiesen wurde (*Alsterberg*, 1925), die Sauerstoffanalyse sehr störend beeinflussen. Wenn die vorhandenen H_2S-Mengen 10 bis 12 mg pro Liter nicht überschreiten, so genügt die mit Rücksicht auf die Schwefelverbindungen bestimmte Standzeit von 24 Stunden; bei höherem H_2S-Gehalt dürfte eine sichere Analyse nach der *Winkler*methode ganz einfach unmöglich sein, doch kann man hier andere Methoden anwenden, worüber ich binnen kurzem in einer anderen Abhandlung berichten werde.

Tabelle XIII.

Methode	H_2S-Zusatz mg pro Liter	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,67	—	—
„	1,4	„	2,17	—3,50	—61,7
Bromoxydierung	1,4	H_3PO_4	5,64	—0,03	— 0,5

Beim Korrigieren des Volumens subtrahierte ich nicht nur die Reagenzmenge, sondern auch das Volumen des zugeführten H_2S-Wassers, da dieser als ***annähernd*** sauerstoffrei zu betrachten ist. Ein Vergleich der von den mit H_2S versetzten Proben erhaltenen Sauerstoffwerte, die nach unveränderter ***Winkler***technik analysiert worden waren, mit den nach der Bromoxydierungstechnik analysierten Proben beweist die Notwendigkeit letzterer Methode. Die Hauptsache beim Experiment ist, daß die Resultate die Richtigkeit der Werte ergaben, die von den nach der Bromoxydierungstechnik behandelten H_2S-haltigen Proben stammten. Das ergibt ein Vergleich der Werte, die von den nach Brom-

oxydierung behandelten Proben stammen, mit den Werten gleichzei
*Winkler*proben ohne H_2S-Zusatz.

2. Vorkommen von SO_2. Unter natürlichen Umständen di
schweflige Säure als im Wasser gelöste Substanz nur in Thermalqu
und in Wasser in vulkanischen Gegenden vorkommen. Als künstl
Verunreinigung dürfte sie dagegen durchaus nicht selten sein; beson
kommt sie als Verunreinigung von Sulfitfabriken (*Sondén*, 1914, S
41, 43, 87) vor. Auch bei schwefliger Säure ist ein gewisser Übersc
an zugeführtem Brom ebenso wie eine lange Einwirkungszeit notwen
da auch hier bei der Reaktion von Brom auf schweflige Säure eine gew
Quantität Polythionsäure entsteht. Dieser Umstand ist interess
da die jodometrische Bestimmung der schwefligen Säure, wie beka
ein umstrittenes Kapitel bildet und die Annahme berechtigt ersche
daß schweflige Säure von Jod nicht ohne weiteres zu Schwefelsä
oxydiert wird.

Die Serie, deren Wert jetzt angeführt werden soll, war nach densel
Prinzipien wie die Serie auf Tabelle XIII angeordnet. Die Proben wur
zuerst mit schwefliger Säure und nachher mit 0,5 ccm Natriumbisulfitlös
(= 6 mg SO_2) versetzt. Das Resultat ist in Tabelle XIV wiedergegeb

Tabelle XIV.

Methode	SO_2-Zusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,59	—	—
"	6	"	0,00	— 5,59	— 100
Bromoxydierung	6	H_3PO_4	5,56	— 0,03	— 0,

Bei der Volumenberechnung wurde auch das Volumen der z
geführten schwefligen Säurelösung subtrahiert.

Wir finden, daß die Werte der Proben, die nach der Bromox
dierungstechnik behandelt wurden, und die Resultate der *Winkler*prob
ohne Zusatz von schwefliger Säure den gleichen Sauerstoffgehalt au
weisen. Dagegen weisen die Proben, welche gleichzeitig mit SO_2 verset
und nach *Winkler* behandelt wurden, keinen Sauerstoff auf. Es i
leicht einzusehen, daß man hier ohne die Bromoxydierungstechn
nichts erreicht. Die O_2-Analysen bei der Erforschung z. B. einer indu
striellen Verunreinigung können vollkommen unrichtig werden.

3. Vorkommen von Hyposulfit. Was über die schweflige Säu
gesagt wurde, läßt sich auch von den Hyposulfiten sagen.

Auch hier will ich eine Serie von Experimenten anführen, die nac
denselben Prinzipien angeordnet ist. Ich gab zu den mit dieser Substan
versetzten Proben 0,5 ccm einer Lösung, die auf 100 ccm 1 g Natrium
hyposulfit enthielt, also pro Probe 5 mg Hyposulfit.

Tabelle XV.

Methode	Hyposulfitzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,42	—	—
„	5	„	4,59	— 0,83	— 15,3
Bromoxydierung	5	H_3PO_4	5,45	+ 0,03	+ 0,6

Bei der Volumenberechnung wurde das Volumen der hinzugefügten Hyposulfitlösung nicht subtrahiert. Diese wurde unmittelbar vorher bereitet und war schwach konzentriert; Hyposulfit reagiert auf elementaren Sauerstoff sehr langsam. Das Resultat der Serie stimmt mit den früheren Experimenten überein.

D. Vorkommen von salpetriger Säure.

Wir erwähnten früher, von welcher Bedeutung das Vorkommen von salpetriger Säure ist, wenn es sich um die Sauerstoffanalyse handelt, weshalb ich hier nicht näher darauf einzugehen brauche. Bei natürlichen Verhältnissen dürfte salpetrige Säure wohl immer höchstens in Konzentrationen von einigen wenigen Milligrammen pro Liter vorkommen, und im allgemeinen genügen die speziellen Methoden, besonders die Andvorbehandlung, zur Eliminierung der Substanz. Schwieriger ist es, wenn sie mit einer der anderen störenden Substanzen kombiniert auftritt oder wenn sie in größeren Mengen vorkommt, was sich bei experimentellen Verhältnissen denken läßt. In diesem Falle kann aber nur die Bromoxydierungstechnik helfen, denn Brom oxydiert Nitrit quantitativ zu Nitrat, eine Reaktion, die man analytisch verwendet. Ich führe hier eine Serie von Experimenten an, die gleich den vorhergehenden angeordnet ist.

Jede Probe wurde mit Brom behandelt und dann mit 0,5 ccm (= 15 mg Natriumnitrit) einer Lösung versetzt, die 3 g Natriumnitrit auf 100 ccm enthielt. Die Ziffern der Analysen von nicht brombehandelten, mit Nitrit versetzten Proben wurden ausgelassen, da hier kein bestimmter Wert zu erreichen war.

Tabelle XVI.

Methode	Nitritzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,31	—	—
Bromoxydierung	15	H_3PO_4	5,36	+ 0,05	+ 0,9

Bei der Volumenberechnung wurde das Volumen der hinzugefügten, unmittelbar vorher bereiteten Nitritlösung nicht subtrahiert, die ebenso sauerstoffhaltig wie das übrige Wasser gewesen sein dürfte. Die Serienwerte zeigen, daß man durch Bromoxydierung ohne weiteres zu korrekten Werten gelangt.

E. Vorkommen von einfachen und zusammengesetzten Cyaniden.

1. Vorkommen von Cyaniden und Rhodaniden. Kaum eine einzige Methode läßt sich allgemein anwenden. So gibt das von mir ausprobierte Bromoxydierungsverfahren bei Anwesenheit von Cyaniden oder Stoffen die zur Bildung von Cyaniden führen (z. B. Rhodanide) unrichtige Werte. Das beruht darauf, daß freies Brom mit Cyanwasserstoff Bromcyan bildet, das auf Salicylsäure nicht wirkt. Da es aber auf K J oxydierend wirkt, werden die Werte zu hoch. Nun dürften diese Stoffe hauptsächlich in künstlich erzeugten Lösungen vorkommen. Doch dürfte es nicht schwer sein, eine solche Fehlerquelle durch speziel ausgearbeitete Methoden zu entfernen. Wie bekannt, werden die Halogencyanide in alkalischer Lösung hydrolysiert und als Endresultat der Reaktion ergeben sich in diesem Falle Cyanat und Bromid. Doch habe ich diesen Umstand nicht näher untersucht.

2. Anwesenheit von Ferro- und Ferricyaniden. Die komplexen Cyanide sind anders beschaffen, denn hier ist das Cyanradikal so fest gebunden, daß das Brom nicht oxydierend wirken kann. Ferro- und Ferricyanide, um die wichtigsten komplexen Cyanide zu nennen, stören aber auf andere Weise und erinnern hier an die entsprechenden einfachen Ferro- und Ferriverbindungen, indem z. B. das Ferrocyankalium reduzierend wirkt, während das Ferricyankalium oxydierend wirkt. Da die genannten komplexen Cyanide und die entsprechenden einfachen Eisenverbindungen sich sonst in jeder Hinsicht voneinander unterscheiden, muß die Frage hier von neuem behandelt werden. Es wurde untersucht, inwieweit das Vorkommen der einen oder anderen Substanz störend wirkt und wie man dem vorbeugen kann. Auch minimale Zuschüsse von Ferrocyankalium verursachen große Verluste im Analysenresultat; Ferricyankalium verursacht dagegen eine Erhöhung des Wertes, welche durch die Verwendung von Phosphorsäure nicht ganz eliminiert wird, wiewohl sie den Wert in der gewünschten Richtung zu verschieben scheint.

Zur Orientierung in dieser Frage will ich die Resultate zweier Versuchsreihen anführen. die nach den gleichen Prinzipien wie die vorhergehenden angeordnet waren.

Beide Serien umfassen je zwei Teilexperimente, die sich voneinander mit Rücksicht auf die hinzugefügte Ferro- oder Ferricyankaliummenge unterscheiden. Sonst bewegten sich beide Serien in ungefähr äquivalenten Mengen der beiden Stoffe. In einigen Analysen nach nicht modifizierter *Winkler*methode verwendete ich Phosphorsäure als Lösungsmittel, um zu zeigen, daß ihre Verwendung *wesentlich* bedeutungslos ist. Das geht auch aus den nach der Bromoxydierungstechnik behandelten Proben hervor wo 50proz. Schwefelsäure verwendet wurde.

Die erste der angeführten Serien umfaßt Analysen zur Erforschung der Bedeutung der Ferrocyanide. Der Ferrocyanidzusatz bestand in der Partialserie A

aus 0,5 ccm eines Reagens, das 1,3 g Ferrocyankalium auf 100 ccm Lösung enthielt, während in der Partialserie B das gleiche Volumen einer halb so starken Lösung dazugegeben wurde.

Tabelle XVII.

Methode	Ferrocyanidzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	4,43	—	—
A Winkler . . .	6,5	"	3,89	— 0,54	— 12,2
A " . . .	6,5	H_3PO_4	4,20	— 0,23	— 5,2
A Bromoxydier.	6,5	H_2SO_4	4,50	+ 0,07	+ 1,6
A "	6,5	H_3PO_4	4,52	+ 0,09	+ 2,0
B Winkler . . .	3,3	H_2SO_4	4,08	— 0,35	— 7,9
B " . . .	3,3	H_3PO_4	4,26	— 0,17	— 3,8
B Bromoxydier.	3,3	H_2SO_4	4,47	+ 0,04	+ 0,9
B "	3,3	H_3PO_4	4,44	+ 0,01	+ 0,2
Winkler	0	H_2SO_4	4,43	—	—

Bei der Berechnung der Volumina wurde das Volumen der hinzugefügten Ferrocyanidlösung nicht subtrahiert. Als Standardwert bei der Berechnung der Abweichungen ging ich vom Mittelwert der Initial- und Schlußprobe aus.

Die nächste Serie in Tabelle XVIII umfaßt Analysen, welche die Bedeutung der Ferricyanide als störende Substanzen bei der Sauerstoffanalyse veranschaulichen sollen. Der Ferricyanidzusatz bestand in der Partikularserie A aus 0,5 ccm eines Reagens, das 1 g Ferricyankalium auf 100 ccm Lösung enthielt, während in der Partikularserie B dasselbe Volumen einer Lösung mit halber Stärke hinzugefügt wurde.

Tabelle XVIII.

Methode	Ferricyanidzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,17	—	—
A Winkler . . .	5	"	5,24	+ 0,06	+ 1,2
A " . . .	5	H_3PO_4	5,28	+ 0,10	+ 1,9
A Bromoxydier.	5	H_2SO_4	5,27	+ 0,09	+ 1,7
A "	5	H_3PO_4	5,20	+ 0,02	+ 0,4
B Winkler . . .	2,5	H_2SO_4	5,20	+ 0,02	+ 0,4
B " . . .	2,5	H_3PO_4	5,18	± 0,0	± 0,0
B Bromoxydier.	2,5	H_2SO_4	5,22	+ 0,04	+ 0,8
B "	2,5	H_3PO_4	5,15	— 0,03	— 0,6
Winkler	0	H_2SO_4	5,18	—	—

Bei der Berechnung der Probenvolumina wurden die Volumina der Ferricyankaliumlösungen nicht subtrahiert.

Es handelt sich nun einfach darum, welcher der beiden störenden Stoffe den Analysenwert am meisten verschiebt. Bei der Prüfung der Resultate finden wir, daß ein Ferricyanidzusatz einen relativ unschuldigen Fehler verursacht, während ein Zusatz von Ferrocyanid

den Wert einer Analyse nach der nicht modifizierten *Winkler*meth sehr bedeutend verschiebt. Damit ist erwiesen, welche Bedeut die Anwendung der Bromoxydierungstechnik hat: ***durch den Zu von Brom zum Ferrocyanid wird dieses zu Ferricyanid, das der dar folgenden Sauerstoffanalyse weniger schadet; die mitgeteilten Werte stätigen dies.*** Hier ist noch hinzuzufügen, daß man die Titrier unmittelbar nach dem Ansäuern der Probe ausführen muß, wobei Fehler am kleinsten wird. Ich will jedoch darauf hinweisen, daß gr Zusätze der störenden Stoffe nicht nach der Bromoxydierungstechn immobilisiert werden können, sondern daß man sich in diesem Fa einer besonderen Technik bedienen muß, ein noch nicht gelöstes Proble

F. Vorkommen von organischen Verunreinigungen.

Die organischen Verunreinigungen sind am schwersten von all unschädlich zu machen. Auch *Winkler* selbst wies (1914) dara hin. Diese Sache wurde bereits früher in dieser Abhandlung berüh (S. 38ff.) und wir gelangten dabei zu Resultaten, die für die Lösu der Frage von großer Bedeutung sind. Wir fanden, daß man d Proben nach dem Laugenzusatz so rasch wie möglich ansäuern mu denn dann wird der Fehler am kleinsten. Die Anwendung der Bron oxydationstechnik ist auch in diesem Falle nützlich, aber man erreich trotz der Anwendung dieser Methodik keinen absolut sicheren Wer Ich will zuerst eine Reihe von Experimenten anführen.

Tabelle XIX.

Das Resultat von Experimenten, die die Wirkungen des *Witte*-Pepton erforschen sollten, wovon 0,5 ccm einer Lösung (enthaltend 6,0 g Substan auf 10 ccm Lösung) zu den Proben gegeben wurden. Jeder Methode ent sprachen drei Proben.

Methode	Peptonzusatz mg pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	5,28	—	—
"	30	"	5,00	—0,28	—5,3
Bromoxydierung	30	H_3PO_4	5,18	—0,10	—1,9

Tabelle XX.

Die in dieser Tabelle angeführten Proben wurden mit 1 ccm einer Lösung versetzt, die aus dem Weißen eines Eies auf 100 ccm bestand. Jeder Methode entsprachen zwei Proben.

Methode	Eiweißzusatz ccm pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	4,25	—	—
"	1	"	4,04	—0,21	—4,9
Bromoxydierung	1	H_3PO_4	4,11	—0,14	—3,3

Tabelle XXI.

Zu den Proben dieser Tabelle wurde 1 ccm frische Milch gegeben. Jeder Methode entsprechen zwei Proben.

Methode	Milchzusatz ccm pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	3,99	—	—
„	1	„	3,87	—0,12	—3,0
Bromoxydierung	1	H_3PO_4	4,02	+ 0,03	+ 0,8

Tabelle XXII.

Die Proben dieser Tabelle wurden mit 1 ccm Urin versetzt, der eine Zeitlang gestanden hatte. Jeder Methode entsprachen zwei Proben.

Methode	Urinzusatz ccm pro Probe	Säure	O_2-Wert ccm pro Liter	Abweichung ccm pro Liter	Abweichung Proz.
Winkler	0	H_2SO_4	3,03	—	—
„	1	„	2,75	—0,28	—9,2
Bromoxydierung	1	H_3PO_4	3,07	+ 0,04	+ 1,3

Bei der Volumenberechnung der Proben wurden in allen Fällen auch die Volumina der hinzugefügten störenden Substanzen subtrahiert. Nach den angeführten Resultaten zu urteilen, trägt eine Bromierung sehr zur *Verbesserung* des Resultats bei, wiewohl es auch dann keineswegs immer korrekt ist (siehe Tabelle XX). In dieser Verbesserung des Resultats existiert aber ein Fehler, den ich bei genauerer Analyse entdeckte: in mit organischer Substanz verunreinigten Proben läßt sich das Brom mit Salicylsäure nicht ganz reduzieren, nicht einmal dann, wenn man die Probe mehrere Tage stehen läßt. Das zeigt sich in der Weise, daß die salicylsäurereduzierende Probe blau wurde, wenn man Jodkalium und Stärkelösung dazu gab. Ich untersuchte die Sache näher, da ich konstatieren wollte, inwiefern hier eine Aktivierung von vorhandenem elementaren Sauerstoff vorlag; dann hätte man die Sache vernachlässigen können. Es verhielt sich aber ganz anders. Das Brom vereinigt sich mit der organischen Substanz und wird für jede Reduktion unzugänglich. Es nimmt vermutlich die Form bromierter Amine oder Eiweiße an, vielleicht auch in geringen Mengen von Bromcyanid oder anderen Verbindungen. So konnte ich konstatieren, daß Salicylsäure nicht imstande ist, z. B. Pentabromaceton zu reduzieren, das doch auf Jodkalium stark oxydierend wirkt. Daß keine Sauerstoffaktivierung stattfand, ging daraus hervor, daß sich die Menge ausgeschiedenen Jods vergrößerte, wenn ich zu den Wasserproben, welche wegen eines gewissen Gehalts an organischer Substanz durch O_2-Zehrung O_2-frei geworden waren, nach dem Bromzusatz noch weitere Quantitäten organischer Substanz gab: *die Jodmenge in der mit Salicylsäure behandelten Probe vergrößerte sich proportional der hinzugefügten*

organischen Substanz. So beruht der verbesserte sauerstoffanalytische Wert in nicht geringem Maße gerade auf diesem Umstand. Doch ist die Bromierungstechnik vom praktischen Gesichtspunkt aus auch mit Rücksicht auf organische Verunreinigungen zu empfehlen, denn im allgemeinen erhält dieser Zuschuß eine kompensierende Bedeutung, da Störung und Kompensation in bestimmten Proportionen zueinander zu stehen scheinen. *Ist also die Menge der lose bromabsorbierenden (darum später KJ-oxydierenden) Substanzen groß, so ergibt sich gleichzeitig ein großes Sauerstoffdefizit, das sich bei sauerstoffreiem Wasser doch auf Kosten des zugeführten absorbierten Broms ausgleicht.* Übrigens werden ganz sicher diese bromierten organischen Komplexe beim Laugenzusatz auf Kosten der eigenen reduzierenden Fähigkeit der organischen Substanz gesprengt, was möglicherweise das gleichzeitig entstehende Manganohydrat nicht berührt. Lange Serien von in der verschiedensten Weise ausgeführten Experimenten ergaben die Richtigkeit der oben angeführten praktischen Regel. Die große Bedeutung des Broms liegt ferner in seiner Funktion als *Konservierungsmittel.* Wir sahen, daß das Analysenresultat schlechter wurde, wenn die Probe nach der *Winkler*methode — auch angesäuert — gestanden hatte, und in der Praxis ist es oft schwierig, die Probe unmittelbar zu analysieren. Die Brombehandlungstechnik gestattet die Ausführung der Analyse bei passenden Gelegenheiten.

Zusammenfassung.

1. Von allen Analysenmethoden für in Wasser gelösten elementaren Sauerstoff ist das von *Winkler* (1888) ausgearbeitete Verfahren am sichersten und einfachsten. Die anderen Methoden sind entweder zu kompliziert für den allgemeinen Gebrauch oder ergeben weniger genaue Werte.

2. Betreffs der dabei notwendigen Reagenzien ist darauf zu achten daß die Manganchlorürlösung nicht durch Eisen in zweiwertiger oder dreiwertiger Form verunreinigt sei. Nachweis und weitere Maßnahmen wurden in der Abhandlung besprochen.

3. Bezüglich der jodkaliumhaltigen Natronlauge ist darauf hinzuweisen, daß der Jodkaliumgehalt genügend hoch sein muß. Direkte Experimente beweisen, daß ein zu niedriger Jodkaliumgehalt im Analysenresultat große Verluste hervorrufen kann, falls das Wasser verunreinigt ist.

4. Die Probe darf nach Zusatz der *Winkler*schen Reagenzien höchstens 15 Minuten stehen bleiben. Längere Zeit schadet der Probe wesentlich, besonders wenn organische Verunreinigungen vorhanden sind. Kann man die Probe nicht unmittelbar analysieren, so muß man sie wenigstens ansäuern.

5. Bei der Titrierung verwendet man wie gewöhnlich eine etwa n/100 Hyposulfitlösung. Sie muß nach der Jodkaliummethode (*Alsterberg*, 1925), nicht nach der bisher allgemein gebräuchlichen Bichromatmethode, eingestellt werden.

6. Die nicht modifizierte *Winkler*sche Analysenmethode dürfte sich wegen vorhandener Verunreinigungen oft nicht anwenden lassen. Hier muß man sich korrigierender Methoden bedienen.

7. Die von *Winkler* (1888, 1914) zu diesem Zwecke auf verschiedene Weise ausgearbeiteten Manganchloridmethoden sind vollständig untauglich, weil sie voraussetzen, daß die zu kompensierenden O_2-Verluste bei der Ansäuerung der Probe erfolgen, wogegen die meisten störenden Substanzen im alkalischen Stadium auf die oxydierte Manganoxydhydratfällung reduzierend einwirken.

8. Die Chlorierungsmethode *Winklers* (1915) mit darauffolgender Rhodankaliumbehandlung ergab, wenigstens mit Rücksicht auf die meistens notwendigen größeren Reagenszusätze, sehr unzuverlässige Werte, da die Chlorlaugen oft durch Chlorite verunreinigt sind, wobei der Rhodanzusatz die Bildung der äußerst störenden Polythionsäuren verursacht.

9. Die Methode *Rideals* und *Stewarts* (1907) mit Voroxydation der Probe mittels Permanganatlösung verursacht bedeutende Fehler, weil dabei eine Aktivierung des vorhandenen, im Wasser gelösten Sauerstoffs entsteht, der jetzt mehr als sonst gegenüber organischen Substanzen direkt oxydierend auftritt. Schon die Reduktion des Permanganatüberschusses mittels Oxalsäure veranlaßt eine solche störende Sauerstoffaktivierung.

10. Die Auswaschungsmethode der Fällung von *Winkler* (1914) und *Bruhns* (1915) zum Zwecke der Entfernung störender Substanzen kann nur in besonderen Fällen nützen, vor allem dann, wenn Nitrit vorhanden ist. H_2S, SO_2, Fe in verschiedenen Formen und organische Verbindungen als störende Substanzen werden z. B. nicht immobilisiert.

11. Die Parallelchlorierungsmethode *Winklers* (1914) — was ich darunter verstehe siehe S. 48 — läßt sich in der Praxis schwer durchführen.

12. Die Eisenverbindungen in verschiedenen Formen lassen sich ohne Anwendung bestimmter Vorbehandlungsmethoden der Probe nur mit großer Schwierigkeit immobilisieren.

13. Auch wenn Nitrite vorhanden sind, bedarf die Probe einer besonderen Behandlung. Außer Methoden von allgemeiner Bedeutung arbeitete man auch spezielle aus. Hier möchte ich besonders bei Anwesenheit kleinerer Nitritmengen die Azidmethode empfehlen.

14. Eine neue Vorbehandlungsmethode, die in dieser Abhandlung dargelegt wird, besteht darin, daß man die Probe vor der Analyse mit freiem Brom behandelt, dessen Überschuß mit Salicylsäure reduziert wird.

15. Das Brom wird in einer etwa n/1 Lösung verwendet und jede Probe (ungefähr 125 ccm) werden 0,5 ccm beigemischt. Die Lösung wird hergestellt, indem man 3 ccm freies Brom, 6 g KBr und 10 ccm 5proz. HCl mit Wasser mischt, so daß 100 ccm Lösung entstehen. Oder man kann 3 g $KBrO_3$, 20 g NaBr und 25 ccm 25proz. HCl zu Wasser mischen, so daß 100 ccm Lösung entstehen.

16. Das Salicylsäurereagens besteht aus 10 g Salicylsäure, 20 ccm 15proz. NaOH und Wasser zu 100 ccm Lösung, wovon 0,5 ccm zur Probe gegeben werden, nachdem diese 24 Stunden mit freiem Brom gestanden hat.

17. Wenn 15 Minuten nach dem Salicylsäurezusatz verflossen sind, ist die Probe zur Behandlung nach der *Winkler*schen Analysenmethode fertig, wobei man am besten die gleichen Reagensmengen wie bei der unveränderten *Winkler*schen Methodik verwendet. Um aber der ausgearbeiteten Methode eine fixierte Form zu geben, möge man als Säure immer Phosphorsäure verwenden, wiewohl diese eigentlich nur den etwa vorhandenen Eisenverbindungen gilt.

18. Durch die neue Methode erreicht man vollkommen sichere O_2-analytische Werte beim Vorhandensein von zwei- und dreiwertigem Eisen. Kontrollanalysen wiesen nach, daß das zweiwertige Eisen die bedeutendsten Störungen hervorruft, da es Verluste im Analysenresultat verursacht; dreiwertiges Eisen verursacht dagegen ein etwas zu hohes Resultat, eine Störung, die bei der Verwendung von Phosphorsäure ganz unterdrückt wird.

19. Besonders störend wirken die oxydierbaren Schwefelverbindungen, vor allem Schwefelwasserstoff, eine auch unter natürlichen Umständen sehr häufig vorkommende Substanz. Es wird durch das hinzugefügte Brom sehr energisch oxydiert, doch muß man hier sicherheitshalber besonders genau sein und die Probe längere Zeit hindurch stehen lassen (z. B. 24 Stunden), denn zu Beginn entstehen Polythionsäuren, die zu ihrer Oxydierung zu Schwefelsäure einer langen Standzeit bedürfen. Beachtet man diesen Umstand, so erzielt man gute Resultate.

20. Die Nitrite werden ohne jede störende Nebenreaktion durch das Brom fast momentan zu Salpetersäure oxydiert, und folglich erzielt die ausgearbeitete Methode auch in diesem Falle ausgezeichnete Resultate.

21. Die ursprüngliche *Winkler*sche Methode erfährt durch etwa vorkommende Ferro- und Ferricyanide Störungen, da die ersteren

zu niedrige, die letzteren zu hohe Resultate verursachen. Doch ist der störende Einfluß der Ferricyanide bei kleinen Mengen von geringer Bedeutung, wenn man ihn mit den Störungen vergleicht, welche die Ferrocyanide in gleichen Mengen ausüben; folglich ist auch in diesem Falle die Anwendung der Bromoxydation mit Rücksicht auf das Resultat sehr vorteilhaft.

22. Wenn organische Verbindungen vorhanden sind, trägt eine Bromoxydierung zur Verbesserung der Werte bei, wiewohl sich diese Substanzen schwer immobilisieren lassen, was nicht nur mit Rücksicht auf diese Methode, sondern auch mit Rücksicht auf früher verwendete Methoden gilt. Wenn es sich um die Voroxydierung einer organischen Substanz mittels Zusatz von Halogenen (Chlor, Brom oder Jod) handelt, so vereinigen sich diese oft in der Weise mit den organischen Verbindungen, daß diese dann oxydierend auf KJ wirken. Doch wird die dadurch hervorgerufene Werterhöhung durch eine entsprechende, den O_2-Wert vermindernde Störung der Substanz kompensiert, wodurch das Resultat dem tatsächlichen Wert im allgemeinen sehr nahe kommt. Übrigens spielt das Brom hier die bedeutsame Rolle eines Konservierungsmittels.

23. Der Bromzusatz übt nur dann einen störenden Einfluß aus, wenn einfache Cyanide oder Rhodanide in der Probe vorkommen, indem das Brom in einer für die Salicylsäurereduktion unzugänglichen Form — nämlich als Bromcyan — gebunden wird, was eine Werterhöhung zur Folge hat. Möglicherweise läßt sich der entstandene Fehler durch besondere Methoden leicht korrigieren, eine Sache, die ich nicht untersuchte.

Nachschrift.

In diesem Zusammenhang kann ich es nicht unterlassen, mein Erstaunen über eine kritische Beurteilung einer meiner Arbeiten, 1925, auszudrücken, die in einem Referat im Zentralblatt für die gesamte Hygiene 11, 230, 1925 erschien. „Verfasser lehnt ferner die Korrektionsmethoden von *Winkler* und *Noll* ab; er übersieht dabei, daß diese gar nicht für nitrithaltiges Wasser vorgeschlagen worden sind, sondern für Wässer mit viel organischen Stoffen, welche einen Teil des durch den Sauerstoff frei gemachten Jods binden." *Winklers Manganchloridverfahren ist aber vor allem dazu bestimmt, die Störungen durch gleichzeitig vorhandene Nitrite zu entfernen* (siehe *Winkler*, 1888, S. 2852 und 1915, S. 125; *Chlopin*, 1898, S. 296; *Kunz*, 1911, S. 11 bis 12; *Ohlmüller-Spitta*, 1921, S. 45ff.)! Dagegen ist das Verfahren *Nolls* (1905) nur für organische Verunreinigungen und nicht für Nitrite bestimmt. Da aber seine Methode eine Verbesserung der von ihm kritisierten und mit besonderer Rücksicht auf die Nitrite ausgearbeiteten *Winkler*schen Methode beabsichtigt, kam in der Literatur die Ansicht zur Geltung,

auch *Nolls* Methode sei für dieselben störenden Stoffe bestimmt (
Kunz, l. c., S. 12; *Ohlmüller-Spitta*, l. c., S. 46). Daß ich die Met
Nolls zusammen mit den speziellen Methoden zur Eliminierung
Nitrite erwähnte, beruhte also darauf, daß ich diese referiere
Darstellungen für richtig hielt (ich erwähnte auch bezüglich des
gegriffenen Punktes, daß ich mich an die Darstellung *Ohlmüller-Sp*
hielte!)

Doch muß ich hier auf etwas hinweisen, das mir früher
gangen ist. *Kunz* (l. c.) hat nämlich die Manganichloridmet
Winklers offenbar gründlich mißverstanden; nach dieser soll ja
eigentliche Probe mit Manganchlorür und Natronlauge, ***nicht aber***
Jodkalium versetzt werden. *Kunz* (vgl. S. 12 und 26) scheint das
unbeachtet gelassen und nur den Wert der mit Manganichlorid
handelten Parallelprobe berücksichtigt zu haben; dieser Irrtum
dazu beigetragen, die ganze Sache in Unordnung zu bringen.

Der Referent macht auch Reservationen betreffs meines Bedenk
gegen die Anwendung der Harnstoffmethode von *Lehmann* und
(l. c.). Es ist nun aus meinen in vorliegender Abhandlung angefüh
Versuchsserien leicht zu ersehen, daß meine Kritik gegen die Harnst
methode, die jedoch ein sehr allgemeines Ansehen nicht nur in
O_2-Analyse, sondern auch in der Nitrit- und Nitratanalyse genie
leider nur zu berechtigt ist. Sehr kleine Nitritquantitäten können zu
ohne Schaden für die folgende O_2-Analyse durch Anwendung
betreffenden Technik eliminiert werden, aber in diesem Falle si
statt dessen die Azidmethoden (*Alsterberg*, 1925) mit Rücksi
auf ihre leichtere Anwendung zu empfehlen. Betreffs der Nitrit- u
Nitratanalyse muß ich mit Rücksicht auf meine bisherigen Experime
die Harnstoffmethode ganz ablehnen. In Zukunft werde ich letzte
Thema in einer besonderen Untersuchung behandeln.

Literatur.

Abel, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **56**, 1923. — *Allison* und *Shive*, S
Science **15**, 1923 (ref. Chem. Centralbl. **1924**, II, 736). — *Alsterberg*, Lu
Universitets Årsskrift, N. F., Avd. 2, **18**, 1922; **20**, **1924a**; Botani
Notiser 1924b (in deutscher Sprache); diese Zeitschr. **159**, 1925; eb
daselbst **166**, 1926. — *American Public Health Association*, Stand
Methods for the Examination of Water and Sewage. New York 1923.
Banco, Chem.-Ztg. **41**, 1917. — *Brezina*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektio
krankh. **53**, 1906; Wiener klin. Wochenschr. 1908. — *Birge* und *Jud*
Wisc. Geol. and Nat. Hist. Survey. Bull. no. XXII, Sc. Ser. no. 7, 1911.
Bruhns, Chem.-Ztg. **39**, 1915; **40**, 1916; **41**, 1917. — *Bunsen*, Gasometrisc
Methoden 1857 (ref. *Kunz*, l. c.). — *Buswell* und *Gallaher*, Journ. of I
and Engin. Chem. **15**, 1923. — *Chlopin*, Arch. f. Hyg. **27**, 1896; **32**, 1898.
Clarke, Analyst **36**, 1911. — *van Eck*, Chem. Weekblad **10**, 1913a (r
Chem. Centralbl. **1913**, II, 304); Zeitschr. f. analyt. Chem. **52**, 1913b.

Hale und *Melia*, Journ. of Ind. and Engin. Chem. 5, 1913. — *Jonsson*, Kemiska undersökningar (aus der Arbeit „Klotentjärnarna“ = die Klotenteiche; schwedisch) Meddel. frånk. Lantbruksstyrelsen Nr. 232, 1921. — *Jorissen* und *Ringer*, Chem. Weekblad 2, 1905 (ref. Chem. Centralbl. 1906, I, 275). — *Kisskalt*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 53, 1906. — *Knauthe*, Das Süßwasser. Neudamm 1907. — *Kolthoff*, Pharm. Weekblad 56, 1919 (ref. Chem. Centralbl. 1919, IV, 309). — *König* und *Haselhoff*, Landwirtschaftl. Jahrb. 62, 1897. — *Korschun*, Arch. f. Hyg. 61, 1907. — *Kunz*, Vergleichung des gasvolumetrischen mit der titrimetrischen Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffs. Inaug.-Diss. Zürich 1911. — *Lebedinzew*, Gasumtausch in abgeschlossenen Wasserbecken und seine Bedeutung für die Fischzucht. St. Petersburg 1905 (ref. *Sondén* 1912). — *Lehmann*, Die Methoden der praktischen Hygiene, 2. Aufl. Wiesbaden 1901 (ref. *Noll* 1917). — *Letts* und *Blake*, Proc. Roy. Dub. Soc. 9, 1900. — *Levy*, Annuaire de l'observatoire de Montsouris 1885 bis 1895 (ref. *Chlopin* 1898). — *Lund*, Proc. of the Soc. f. exper. Biol. and Med. 19, 1921. — *Mohr*, Lehrbuch der chemisch-analytischen Titriermethoden, 2. Aufl., Braunschweig 1862. — *A. Müller*, Arch. f. Hyg. 89, 1920. — *C. G. Müller*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1899. — *Noll*, ebendaselbst 18, 1905; 30, 1917. — *Ohlmüller* und *Spitta*, Die Untersuchung des Wassers und des Abwassers, 4. Aufl. Berlin 1921. — *Pleissner*, Arbeiten aus dem kais. Gesundheitsamt 34. 1910. — *Purvis* und *Black*, Proc. Cambridge Philos. Soc. 17, 1914. — *Rideal* und *Stewart*, Analyst 26, 1901. — *Romijn*, Rec. d. Trav. d. Pays-Bas 15, 1896. — *Schoorl*, Chem. Weekblad 10, 1913 (ref. Chem. Centralbl. 1913, II, 538). — *Schreiber*, Mitteil. aus der Prüfungsanstalt für Wasserversorgung, Heft 6, 1906. — *Schulek*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 62, 1923. — *Schützenberger* und *Gérardin*, Bull. Soc. chim. 18, 1872. — *Schützenberger* und *Risler*, ebendaselbst 19, 1873. — *Smit*, Chem. Weekblad 12, 1915 (zwei Abhandl.; ref. Chem. Centralbl. 1918, II, 304 und 538). — *Sommer* und *Pincas*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 48, 1915. — *Sondén*, Anteckningar rörande svenska vattendrag med hänsyn till beskaffenheten av vattnet i desamma. Enligt uppdrag av dikningslagskommittén. Stockholm 1914 (schwedisch). — *Sondén* und *Henningsson*, Vattnet i sjöar och vattendrag inom Stockholm och i dess omgivningar. Afdeln. 1, Bihang II, till Stockholms stads hälsovårdsnämnds årsberättelse 1910. Stockholm 1912 (schwedisch). — *Spitta*, Arch. f. Hyg. 38, 1900. — *Thresh*, Journ. of Chem. Soc. 57, 1890. — *Tillmans*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 20, 1910. — *Treadwell*, Quantitative Analyse, 11. Aufl., 1923. — *Weigelt*, Abwässer und Fischwässer. Berlin 1900. — *Winkler*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 21, 1888; Zeitschr. f. analyt. Chem. 53, 1914; Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußm. 29, 1915 (zwei Abhandl.); Zeitschr. f. angew. Chem. 29, 1916.

Über proteolytische Fermente im Serum. I.

Von

Hans J. Fuchs.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts
der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1925.)

Mit 17 Abbildungen im Text.

Die eiweißspaltende Wirkung des Blutserums steht seit geraun
Zeit im Mittelpunkt einer lebhaften Diskussion. Es ist sicher, d
unter bestimmten Umständen im Serum allein oder in mit gekocht
Organeiweiß versetztem Serum eine Eiweißspaltung auftreten kar
Ebenso sicher ist es aber, daß unter anderen Verhältnissen das Seru
eine sonst stattfindende Eiweißspaltung stark einschränken ka
(Antitrypsin).

Am schärfsten finden diese widerstreitenden Verhältnisse Ausdru
in den Arbeiten von *Abderhalden*[1]), nach denen normales Serum ke
eiweißspaltendes Ferment enthält und solches nur bei gewissen Orga
veränderungen führt, und in der von *R. Stephan*[2]), nach der Seru
stets ein Ferment tryptischer Natur enthält, dessen Menge der d
Gerinnungsferments etwa parallel geht und das nach *Stephans* Ansic
auch in Beziehung zur Gerinnung steht.

Nach *Stephan* wird im Normalserum die Tätigkeit dieser Protea
nur durch die kolloide Struktur des Serums verhindert und tritt sofo
hervor, wenn man diese Struktur durch gewisse Eingriffe, wie hal
stündiges Erhitzen auf 56° C oder Schütteln mit Chloroform verände
Nun verhindert ein Umstand, daß man die Arbeiten der *Abderhalde*
schen Schule und diejenigen *Stephans* miteinander vergleichen kan
und das ist der, daß bei der *Abderhalden*schen Schwangerschaftsreaktio
Menschenserum und menschliches Plazentaeiweiß miteinander in B

[1]) *Emil Abderhalden*, Abwehrfermente. Berlin, Verlag J. Springer, 191
[2]) *R. Stephan* und *Erna Wohl*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 2
5 bis 6, 1921.

[rührung] gebracht wurden, während *Stephan* die eiweißspaltende Kraft [einer] Menschensera mit Hilfe von *Grübler*schem Carminfibrin, also, [mit] einem tierischen Eiweiß[1]), feststellte.

Es erscheint mir deshalb von Interesse, zu sehen, ob nicht von [vornherein] ein Unterschied im Verhalten von Serum gegenüber arteigenem und artfremdem Fibrin besteht.

Methodik.

Die Methodik der Untersuchungen besteht grundsätzlich in dem von [Abderhalden] angegebenen Verfahren der Prüfung im Dialysierschlauch,

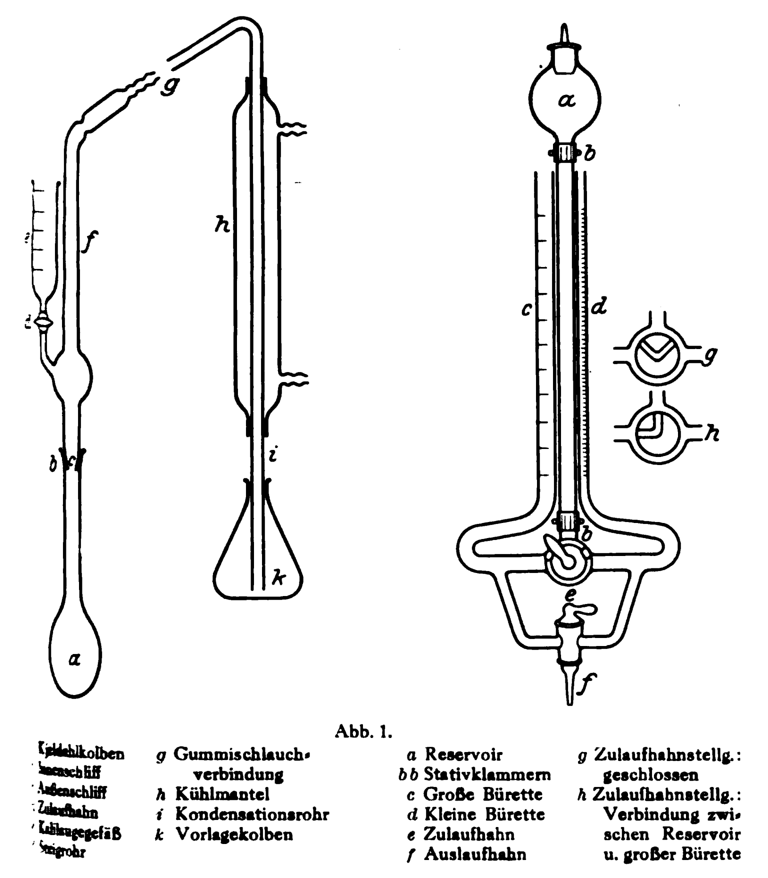


Abb. 1.

a Kjeldahlkolben
b Innenschliff
c Außenschliff
d Zulaufhahn
e Kühlungsgefäß
f Steigrohr
g Gummischlauchverbindung
h Kühlmantel
i Kondensationsrohr
k Vorlagekolben

a Reservoir
b b Stativklammern
c Große Bürette
d Kleine Bürette
e Zulaufhahn
f Auslaufhahn
g Zulaufhahnstellg.: geschlossen
h Zulaufhahnstellg.: Verbindung zwischen Reservoir u. großer Bürette

Die Qualität der Abbauprodukte wurde mittels Biuretprobe, die Quantität mittels meiner Modifikation der Mikrokjeldahlmethode nach *Bang* bestimmt[2]).

---

[1]) Briefliche Mitteilung von Dr. Grübler & Co., Leipzig.
[2]) Hergestellt von Glasbläserei Alois Schmidt, Breslau.

Die neue Anordnung, die ein bequemeres, rascheres und sic
Arbeiten bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffs des zu untersuche
Materials als die von *Bang* angegebene Apparatur ermöglicht, setzt
aus folgenden Teilen zusammen:

1. Verbrennungskolben aus Jenaer Glas mit Normalschliff.
2. Steigrohr aus Jenaer Glas. Dieses beginnt unten mit dem G stück zum Normalschliff aller Kolben und geht darauf in die Tropf über, an die ein dem Tropfrohr entgegengesetzt liegendes zylindri Gefäß mit Hahn zur Aufnahme von Kalilauge angeschmolzen ist. Kugel setzt sich nach oben in das erweiterte, senkrecht emporsteig Steigrohr fort, das im obersten Drittel stumpfwinklig nach vorn abb Im vorderen Stück liegt zwischen zwei Einengungen Glaswolle zum halten des Wassers. Das Ende des Rohres ist schwach verjüngt.
3. Das ein kurzes Stück ansteigende, dann spitzwinklig nach u abgebogene, senkrechte Kondensationsrohr, das vom Knick abwärt zwei Drittel seiner Länge von einem Kühlwassermantel umgeben ist. der Mitte des Rohres befindet sich ein Kugelrückschlagventil aus Jenaer (
4. Die Vorlage. Zu dieser eignet sich am besten ein Erlenmeyerko aus Jenaer Glas.

Steigrohr und Kondensationsrohr sind durch ein fingerlanges St dickwandigen, engen Gummischlauches miteinander verbunden. Gesamtapparatur wird von einem besonders dazu geeigneten Stativ halten, durch das — je nach Konstruktion — beliebig viele Armat nebeneinander in einfachster Anordnung getragen werden können.

Die zur Titration der vorgelegten Flüssigkeit verwendete Bür besteht aus einem Reservoir, mit dem durch einen entsprechenden Z wegehahn von den zwei Bürettenrohren jedes einzelne nach Belieben Kommunikation gebracht werden kann. Beide kalibrierten Rohre s mit Milchglas hinterlegt, in dessen Mitte sich ein schmaler, blauer Strei zwecks genauester Ablesung befindet. Das linke Rohr enthält 20,0 und ist in Fünfzigstel Kubikzentimeter geteilt, das rechte enthält 1 ccm Zweihundertstel Kubikzentimeter geteilt. Beide Rohre kommunizie wiederum mit dem Auslaufhahn, so daß nach Belieben durch Rechts- c Linksdrehen des Hahnes dem rechten oder linken Rohre Flüssigkeit nommen werden kann. Die Titrationsweite umfaßt also 21 ccm, w bei exaktem Arbeiten bis auf $^1/_{200}$ ccm genau titriert werden kann.

Beschreibung der Untersuchung auf Gesamtstickstoff.

1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit wird zusammen mit 1,5 konzentrierter stickstofffreier Schwefelsäure und 5 Tropfen 10proz. Kup sulfatlösung + einer Messerspitze Kaliumsulfat im Verbrennungskol unter dem Abzug erhitzt, bis die Substanz völlig zerstört ist, was an Farblosigkeit der Flüssigkeit erkannt werden kann.

Nach vollständigem Abkühlen des Kolbens werden dazu etwa 30 c Aqua dest. vorsichtig zugesetzt.

Darauf wird der Kolben mit seinem Halsschliff an den Schliff Steigrohres angeschlossen, nachdem vorher ein mit entsprechender Me Schwefelsäure von bekanntem Titer versehener Vorlagekolben an d Kondensationsrohr so vorgelegt worden ist, daß das Rohrende in Flüssigkeit eintaucht.

Darauf wird zunächst der Strom des Kühlwassers geregelt, in an die Kugel angeschmolzene zylindrische, mit Hahn versehene Ge

4proz. Kalilauge eingefüllt (nachdem vorher der Hahn geschlossen wurde!) und die Flamme entzündet. Sodann wird der Hahn des zylindrischen Gefäßes geöffnet, man läßt bis zum nächsten eingeritzten Strich — das sind 12 ccm — Kalilauge in den Kolben einfließen, wobei die verdrängte Luft durch die vorgelegte Flüssigkeit getrieben wird, und schließt sodann den Hahn.

Der Kolben wird nun rasch und stark erhitzt, bis sich im Kondensationsrohr Flüssigkeit in größerer Menge zeigt, was ungefähr 5 Minuten zu dauern pflegt. Dann wird die Vorlage gesenkt, so daß sich das Kondensationsrohr außerhalb der vorgelegten Flüssigkeit befindet, das Ende des Kondensationsrohres in die Vorlage abgespült und etwa 5 Minuten weitererhitzt. Tritt dabei Stoßen im Kolben ein, was auch durch das von Bang empfohlene Talkum nicht vollständig verhindert werden kann, so verhütet das kleine Rückschlagventil sicher das Zurückfließen der Flüssigkeit aus dem Kondensationsrohr in den Verbrennungskolben.

Ist die Destillation beendigt, so wird mit etwas Aqua dest. das Ende des Kondensationsrohres in das vorgelegte Gefäß abgespült und dieses sodann fortgenommen. Darauf wird die Flamme abgedreht, der Verbrennungskolben durch vorsichtige Drehbewegung von dem Steigrohr losgelöst und mit kaltem Wasser vollgefüllt abgesetzt.

Zur Titration der in der Vorlage befindlichen Flüssigkeit läßt man beide Bürettenrohre nacheinander bis zum obersten Striche vollaufen, schließt von beiden die Verbindung mit dem Reservoir, das zu dreimaliger Füllung ausreicht, ab und läßt langsam aus dem breiten Rohre Titrationsflüssigkeit in die Vorlage tropfen, bis sich das Herannahen der Neutralisation bemerkbar macht. Man geht sodann genau bis zum nächsten Teilstrich weiter — was man mit der Lupe kontrolliert — und setzt die Titration mit dem engen, feiner kalibrierten Bürettenrohr bis zur völligen Neutralisation weiter fort.

Diese Apparatur läßt sich sowohl für Mikro- als auch für Makrokjeldahl benutzen. Zum Makrokjeldahl werden entsprechend größere Verbrennungskolben mit gleichem Normalschliff und größere Vorlagekolben benutzt.

Die Vorzüge dieser Apparatur gegenüber der von *Bang* und ähnlichen anderen äußern sich darin, daß einmal beim Zusatz der Kalilauge und Neutralisation der Schwefelsäure kein Ammoniak entweichen kann, zweitens, daß durch das starke und rasche Erhitzen der Flüssigkeit das Ammoniak sicherer ausgetrieben wird als durch Durchleiten von Wasserdampf, drittens, daß der Schliff größere Sicherheit bietet als ein Gummistopfen, viertens, daß die Beweglichkeit des Verbrennungskolbens und Steigrohres vor Bruch schützt und leichteres Arbeiten ermöglicht, fünftens, daß das Rückschlagventil unvorhergesehenes Zurückfließen der vorgelegten Flüssigkeit in den Verbrennungskolben selbsttätig verhütet und damit das dauernde Beobachten der Apparatur während seiner Tätigkeit überflüssig macht.

Die Bürette erspart ein mehrmaliges Wiederauffüllen des leergelaufenen Rohres bei der *Bang*schen Bürette, wobei durch adhärierende Flüssigkeit Fehler entstehen, gestattet also ein schnelleres und dabei exakteres Titrieren.

Das Wesentlichste aber ist, daß die Fehlergrenze gegenüber der *Bang*schen Apparatur bis 0,0007 mg Stickstoff herabgedrückt ist, wie eine große Anzahl von Kontrollversuchen ergeben hat.

Diese Apparatur wurde bei allen später beschriebenen Versuchen regelmäßig verwendet.

Zur Dialyse wurden Dialysierschläuche von *Schleicher* und S
Düren, verwendet. Sämtliche Schläuche, große wie kleine, wurde
Gebrauch geeicht.

Zu diesem Zwecke wurden sie zunächst in fließendem Wasser me
Stunden eingeweicht, sodann einen Tag lang in Chloroformwasser geh
Darauf wurden sie 30 Sekunden in Aqua dest. gekocht un
sterilisierte Gefäße, die weiter unten beschrieben werden, geb
Sodann wurden sie bis fingerbreit unterhalb des Randes mit ste
aus frischen Hühnereiern unter Beobachtung aller Kautelen gewonn
Hühnereiweiß gefüllt und mit sterilem Aqua dest. bis zu gleicher
umgeben. Die Luft über dem Wasser wurde — wie weiter unte
schrieben — mit Chloroformdampf gesättigt gehalten und das geschlo
Gefäß 24 Stunden bei 37° C aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit w
die Außenflüssigkeit auf Eiweiß geprüft: Konnte darin solches auch
in den geringsten Spuren nachgewiesen werden, so wurden die Schlä
vernichtet. Schläuche, die kein Hühnereiweiß durchgelassen hatten, wu
24 Stunden in fließendem Wasser gespült und der gleichen Prüfung
10proz. *Witte*-Peptonlösung in Aqua dest. unterzogen. Solche Schläu
die gleichmäßiges Diffundieren von Pepton innerhalb 24 Stunden zei
wurden mit chinesischer Tusche am oberen Rande numeriert und in ste
Aqua dest., dem etwas Chloroform zugesetzt war, in verschlossener Fla
aufbewahrt.

Dialysiergefäße.

Es wurden zweierlei Dialysiergefäße verwendet: solche für die gr
und andere für die kleinen Dialysierschläuche.

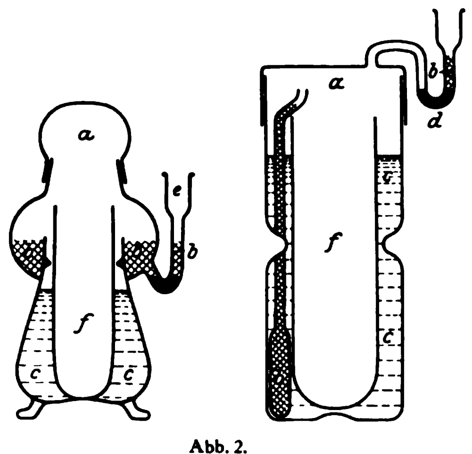


Abb. 2.

a Kappenverschluß
b Chloroformbehälter
c Außenflüssigkeit
d Quecksilberverschluß
e Einfülltrichter
f Hülseninhalt

Die großen bestanden aus länglichen Gefäßen aus Jenaer Glas, de
Hals etwas verengt war. Gleichzeitig mit dem Schlauch wurde ein glei
langes, unten erweitertes Röhrchen aus Jenaer Glas hineingebracht,
Chloroform enthielt. Um quantitativ genau arbeiten zu können, wur
die Gefäße mit Stopfen verschlossen, die mit einem S-förmig durchbohr
Rohre versehen waren, in dem sich ein paar Tropfen Quecksilber befand

Auf diese Art konnte einerseits kein Wasser verdunsten, andererseits war ein Platzen des Gefäßes bei Erwärmung auf 37° verhütet.

Die kleinen tragen innen einen ringförmigen Behälter für Chloroform, von dem an einer Stelle ein U-förmiges Rohr nach außen geführt ist. Dieses endet mit einer trichterförmigen Erweiterung, um die Beschickung mit Chloroform zu erleichtern. Als Verschluß dient eine Überfangkappe aus gleichem Glase mit Innenschliff, der luftdicht zu dem Außenschliff des Gefäßhalses paßt. Drei am Boden angeschmolzene Glasfüße machen das Kölbchen standfest. Zum Gebrauch wurde das Kölbchen in strömendem Dampf sterilisiert, sofort nach Herausnahme aus dem Sterilisiergefäß und Abkühlung zum Versuch Chloroform durch das seitliche Rohr in den ringförmigen Behälter gebracht, die Kappe aufgesetzt und nach Abkühlung das Rohr mit einigen Tropfen Quecksilber verschlossen. Sodann wurde der sterilisierte Dialysierschlauch nach raschem Öffnen des Gefäßes eingesetzt, die zu dialysierende Flüssigkeit mit steriler Pipette sorgfältig in den Schlauch gebracht und ebenso die Außenflüssigkeit steril um den Schlauch eingefüllt, worauf die Kappe wieder aufgesetzt und das Gefäß in den Brutschrank gebracht wurde.

Zur Entnahme wurde entweder aus der Außenflüssigkeit mit steriler Pipette die gewünschte Menge vorsichtig entnommen, oder es wurde fast die ganze Außenflüssigkeit entfernt, mehrmals mit der gleichen Lösung nachgefüllt und mit sterilem Glasröhrchen unter Zuhilfenahme der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Versuchsmaterial.

Zu allen Versuchen wurden frische, sterile Sera verwendet. Die verschiedenen Standardfibrine wurden aus frischen Seris in größerer Menge durch Schlagen gewonnen. Sie wurden 24 Stunden in fließendem Wasser gewaschen und so lange gegen Aqua dest. dialysiert, bis die Biuretprobe der Außenflüssigkeit negativ ausfiel. Darauf wurden sie nach vollständiger Trocknung im Exsikkator über Chlorcalcium bei 45° C im Mörser pulverisiert.

Der Gesamtstickstoffgehalt der Fibrine ergab für

0,1 g Pferdefibrin	17,3275 mg N
0,1 g Rinderfibrin	17,241 mg N
0,1 g Hammelfibrin	17,623 mg N

Ergebnisse.

Versuch I.

150 ccm fassende sterilisierte Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer Glas wurden unter Beobachtung aller Kautelen mit je 100 ccm Serum + 0,1 g Fibrin beschickt. Als Verschluß diente ein sterilisierter Gummistopfen, der mit einem S-förmig gebogenen Rohre durchbohrt war. In diesem befand sich Chloroform, das durch Quecksilber gegen die Außenluft abgeschlossen war. Dadurch war der Luftraum im Kolben stets mit Chloroformdampf gesättigt und konnte Wasser aus dem Serum nicht verdampfen. Bei dieser Anordnung wird die sonst übliche Überschichtung mit Toluol nach *Abderhaldens* Vorschrift umgangen, die eine exakte Bestimmung des N-Gehalts des Serums infolge Bildung von koaguliertem Eiweiß an der Serum-Toluolgrenze unmöglich macht.

Chloroform bewirkt — wie Parallelversuche ohne solches erge haben — weder Lähmung noch Steigerung der fermentativen Vorgär

Die Kolben wurden bei 37° C im Brutschrank gehalten. N je 12 Stunden wurden aus den mehrfach vorsichtig geschüttel Gefäßen je 3 ccm entnommen und durch ein doppeltes Filtercl filtriert. Von je 1 ccm der Filtrate wurde der Gesamtstickstoff mit der beschriebenen Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Die Result sind aus folgenden Tabellen zu ersehen.

a) 100 ccm Pferdeserum + 0,2 g Fibrin.

Stdn.	1. Pferde-fibrin mg	Differenz mg N	2. Hammel-fibrin mg	Differenz mg N	3. Rinder-fibrin mg	Differenz mg N
0	13,4680	0,0000	13,4680	0,0000	13,468	0,000
12	—	—	14,8470	1,3790	14,501	1,033
24	13,4680	0,0000	15,1970	1,7290	14,826	1,418
36	—	—	15,5860	2,1180	15,320	1,852
48	13,4715	0,0035	15,7570	2,2890	15,484	2,016
60	—	—	16,0530	2,5850	15,660	2,192
72	13,4680	0,0000	16,2885	2,8205	15,939	2,571
84	—	—	16,4160	2,9480	15,970	2,502
96	13,4722	0,0042	16,4580	2,9900	16,046	2,578
Gesamtabbau:		0,0042 = 0,01 Proz.		2,9900 = 8,2 Proz.		2,578 = 7,5 Pro

b) 100 ccm Rinderserum + 0,2 g Fibrin.

Stdn.	1. Rinder-fibrin mg	Differenz mg N	2. Hammel-fibrin mg	Differenz mg N	3. Pferde-fibrin mg	Differenz mg N
0	13,139	0,000	13,1390	0,0000	13,1390	0,0000
12	—	—	14,4980	1,3590	14,2210	1,0820
24	13,140	0,001	15,0860	1,9470	14,8970	1,7580
36	—	—	15,3710	2,2320	15,1155	1,9765
48	13,139	0,000	15,5335	2,3945	15,3140	2,1750
60	—	—	15,9890	2,8500	15,6460	2,5070
72	13,140	0,001	16,1440	3,0050	15,8710	2,7320
84	—	—	16,3830	3,2440	16,0130	2,9740
96	13,140	0,001	16,4000	3,2610	16,1410	3,0020
108	—	—	16,4400	3,2650	16,1500	3,0210
Gesamtabbau:		0,001 = 0,003 Proz.		3,2650 = 9,5 Proz.		3,0210 = 8,7 Proz.

c) 100 ccm Hammelserum + 0,2 g Fibrin.

Std.	1. Hammelfibrin mg	Differenz mg N	2. Rinderfibrin mg	Differenz mg N	3. Pferdefibrin mg	Differenz mg N
0	13,2680	0,0000	13,2680	0,0000	13,268	0,000
12	—	—	14,6260	1,3580	14,419	1,151
24	13,2685	0,0005	15,1480	1,8800	14,913	1,645
36	—	—	15,5330	2,2650	15,398	2,130
48	13,2680	0,0000	15,8460	2,5780	15,616	2,448
60	—	—	16,1310	2,8630	15,928	2,660
72	13,2695	0,0015	16,3145	3,0465	16,184	2,916
84	—	—	16,4840	3,2160	16,312	3,044
96	13,2690	0,0010	16,4910	3,2230	16,341	3,073
108	—	—	16,5000	3,2320	16,350	3,082
Gesamtabbau:		0,0010 = 0,003 Proz.		3,2320 = 9,3 Proz.		3,082 = 8,9 Proz.

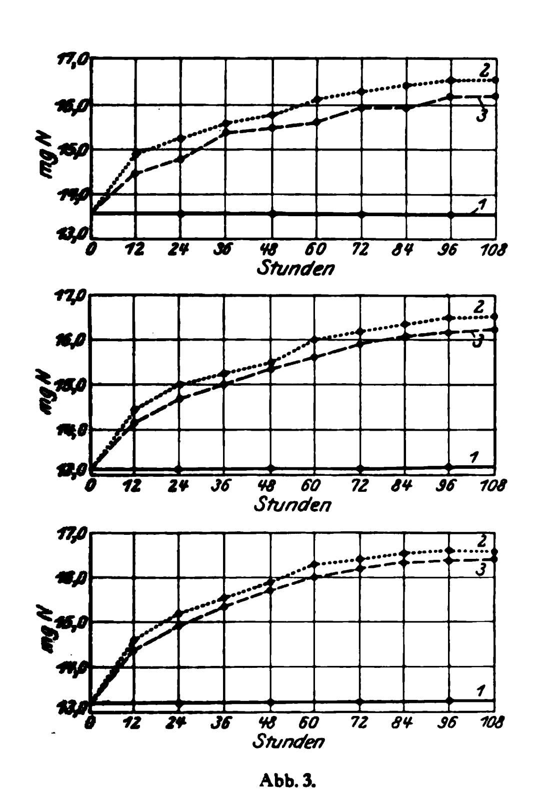


Abb. 3.

Wiederholung.

d) 100 ccm **Pferdeserum** + 0,2 g **Fibrin.**

Stdn.	1. Pferdefibrin mg	Differenz mg N	2. Hammelfibrin mg	Differenz mg N	3. Rinderfibrin mg	Differenz mg N
0	14,124	0,000	14,124	0,000	14,124	0,000
12	—	—	14,989	0,875	14,623	0,499
24	14,124	0,000	15,062	0,983	14,921	0,797
36	—	—	15,434	1,310	15,169	1,044
48	14,132	0,008	15,617	1,493	15,532	1,408
60	—	—	16,134	2,010	15,944	1,820
72	14,132	0,008	16,384	2,260	16,242	2,118
84	—	—	16,543	2,419	16,387	2,263
96	14,136	0,012	16,621	2,497	16,408	2,274
Gesamtabbau:		0,012 = 0,03 Proz.		2,497 = 7,08 Proz.		2,274 = 6,6 Proz.

e) 100 ccm **Rinderserum** + 0,2 g **Fibrin.**

Stdn.	1. Rinderfibrin mg	Differenz mg N	2. Hammelfibrin mg	Differenz mg N	3. Pferdefibrin mg	Differenz mg N
0	13,454	0,000	13,454	0,000	13,454	0,000
12	—	—	14,523	1,069	14,336	0,992
24	13,454	0,000	15,186	1,732	14,933	1,479
36	—	—	15,393	1,939	15,346	1,892
48	13,454	0,000	15,646	2,102	15,532	2,078
65	—	—	16,044	2,590	15,846	2,392
72	13,460	0,006	16,122	2,668	15,932	2,478
84	—	—	16,282	2,828	16,114	2,660
96	13,454	0,000	16,310	2,856	16,141	2,687
108	—	—	16,383	2,929	16,152	2,698
Gesamtabbau:		0,000 = 0,00 Proz.		2,929 = 8,3 Proz.		2,698 = 7,9 Proz.

f) 100 ccm **Hammelserum** + 0,2 g **Fibrin.**

Stdn.	1. Hammelfibrin mg	Differenz mg N	2. Rinderfibrin mg	Differenz mg N	3. Pferdefibrin mg	Differenz mg N
0	13,276	0,000	13,276	0,009	13,276	0,000
12	—	—	14,734	1,458	14,523	1,247
24	13,276	0,000	15,222	1,946	15,040	1,764
36	—	—	15,548	2,272	15,464	2,188
48	13,276	0,000	15,853	3,577	15,633	2,357
60	—	—	16,131	2,855	15,943	2,667
72	13,280	0,004	16,320	3,044	16,231	2,955
84	—	—	16,441	3,165	16,332	3,056
96	13,280	0,004	16,462	3,186	16,338	3,062
108	—	—	16,483	3,207	16,340	3,064
Gesamtabbau:		0,004 = 0,01 Proz.		3,207 = 9,2 Proz.		3,064 = 8,8 Proz.

Ein Vergleich der Stäbe zeigt, daß die Sera arteigenes Fibrin überhaupt nicht, artfremdes Fibrin dagegen merklich abbauen. Der Abbau ist allerdings im Verhältnis zu den großen Mengen von Versuchs-

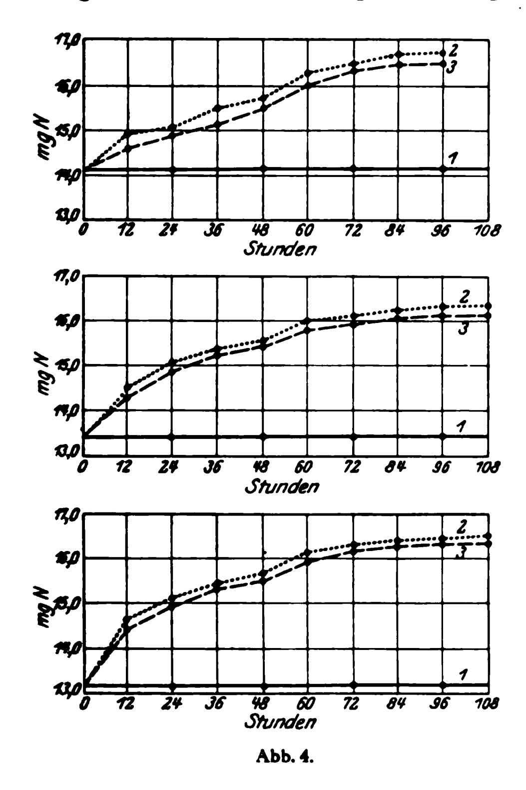


Abb. 4.

material, die verwendet wurden, recht gering (etwa 10 Proz.). Er erfolgt am stärksten innerhalb der ersten 20 Stunden, nimmt allmählich ab und hört in der 108. Stunde fast gänzlich auf.

Versuch II.

Es lag nahe, für die abnehmende Geschwindigkeit der Reaktion die sich bildenden Spaltprodukte verantwortlich zu machen und durch deren Fortschaffung eine Verstärkung des Abbaues zu erstreben.

Zu diesem Zwecke wurden die Versuche in Dialysierhülsen wiederholt, die — wie unter Methodik angegeben — geeicht worden waren. In jede Hülse kam unter Heranziehung aller Kautelen 5,0 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin; die Außenflüssigkeit — sterilisiertes, destilliertes Wasser — betrug 30,0 ccm, wobei die Flüssigkeitsspiegel der Innen- und Außenflüssigkeit ungefähr gleich hoch standen.

Alle 12 Stunden wurden 2 ccm der Außenflüssigkeit steril ent nommen und von je 1 ccm der Gesamtstickstoffgehalt ermittelt. Dafü wurden jedesmal wieder 2 ccm Aqua dest. steril. der Außenflüssigke zugesetzt und in die Gesamtstickstoffmenge mit einberechnet.

5,0 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. a Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Pferdefibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm	3. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,0000	0,000	0,000
12	—	3,780	3,225
24	0,0216	4,620	4,515
36	—	5,250	4,536
48	0,0280	5,460	4,935
60	—	5,565	5,124
72	—	5,880	5,440
84	—	5,890	5,480
96	0,0280	5,964	5,502
108	—	6,074	5,691
Gesamtabbau:	0,0280 mg N = 0,16 Proz.	6,074 mg N = 34,46 Proz.	5,691 mg N = 33,01 Proz.

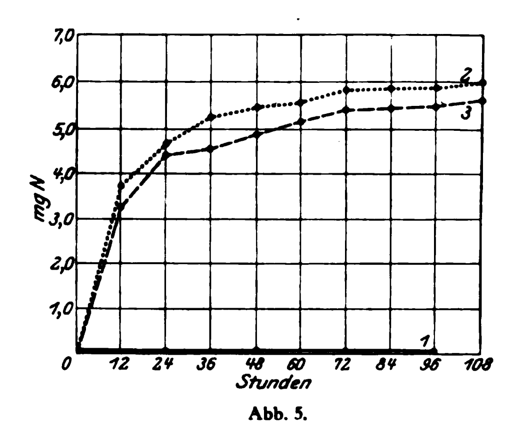


Abb. 5.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuchs mit dem vorhe angegebenen, so ersieht man, daß der Abbau der Fibrine in der Di alysierhülse in gleicher Weise, aber in viel höherem Maße stattfinde als im Glasgefäß, in dem die Abbauprodukte dauernd in Berührung mit dem reagierenden System bleiben. Auch hier noch sistiert de anfangs höher ansteigende und länger anhaltende Abbau der artfremden Fibrine nach etwa 108 Stunden. Diese Feststellung wurde in mehreren Versuchen gleichmäßig gefunden.

Wiederholung.

10 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. als Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Pferdefibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm	3. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000	0,000
12	—	3,360	3,150
24	0,000	4,340	3,934
36	—	5,340	4,536
48	0,014	5,544	4,920
60	—	5,796	5,348
72	0,014	5,824	5,586
84	—	5,894	5,670
96	0,028	5,950	5,740
108	—	5,992	5,782
Gesamtabbau:	0,028 mg N = 0,11 Proz.	5,992 mg N = 34,01 Proz.	5,782 mg N = 33,41 Proz.

Abb. 6.

Ein Vergleich der Versuche lehrt, daß die dialysierbaren Abbauprodukte der kolloiden Substanzen in der Tat auf den Abbau hemmend wirken: durch ihre Entfernung aus dem Serum geht der Abbau bedeutend weiter, kommt allerdings schließlich durch die Anreicherung der Außen- und damit der Innenflüssigkeit auch hier zum Stehen.

Es wurde nunmehr auch diese Anreicherung durch mehrfachen, vollständigen Wechsel der Außenflüssigkeit verhindert.

Versuch III.

Es wurde eine neue Versuchsreihe mit entsprechend veränderter Versuchsanordnung angesetzt. In dieser wurde alle 12 Stunden die Außenflüssigkeit mittels steriler Vollpipette entfernt, mehrmals mit sterilem Aqua dest. nachgespült und sodann das vorher im Gefäß enthalten gewesene Quantum steriles Aqua dest. hineingebracht.

5,0 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Pferdefibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm	3. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000	0,000
12	—	3,465	3,192
24	0,014	3,416	3,094
36	—	0,308	0,3892
48	0,007	0,252	0,168
60	—	0,056	0,056
72	0,000	0,014	0,014
84	—	0,000	0,028
96	0,000	0,000	0,000
Gesamtabbau:	0,021 mg N = 0,12 Proz.	7,511 mg N = 42,63 Proz.	6,9241 mg = 40,16 Proz

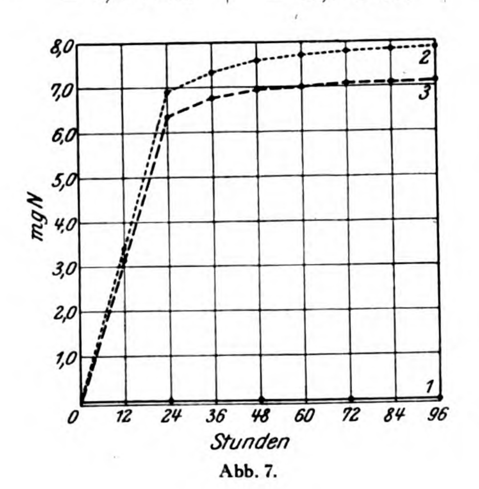


Abb. 7.

Wiederholung.

5,0 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Pferdefibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm	3. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000	0,000
12	—	3,094	2,926
24	0,028	2,856	2,779
36	—	0,364	0,371
48	0,000	0,324	0,201
60	—	0,147	0,042
72	0,000	0,028	0,000
84	—	0,000	0,000
Gesamtabbau:	0,028 mg N = 0,16 Proz.	6,813 mg N = 38,66 Proz.	6,319 mg N = 36,6 Proz.

Es ist aus diesem Versuch, ebenso wie aus anderen, parallel dazu angestellten ersichtlich, daß der Abbau artfremden Fibrins zu Anfang stark einsetzt, um sich kurze Zeit auf der fast gleichen Intensität zu halten und dann sehr rasch abzufallen.

Die in der Außenflüssigkeit des Gefäßes, in dem sich Pferdeserum mit Pferdefibrin zusammen befand, gefundene Gesamtstickstoffmenge stellt den Reststickstoffgehalt des Pferdeserums dar.

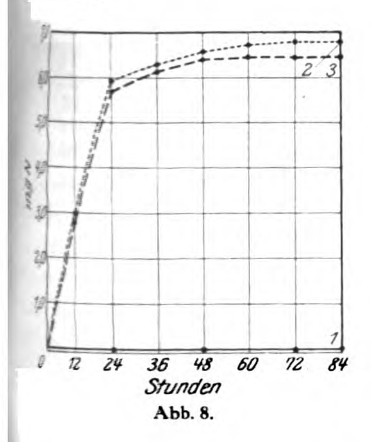


Abb. 8.

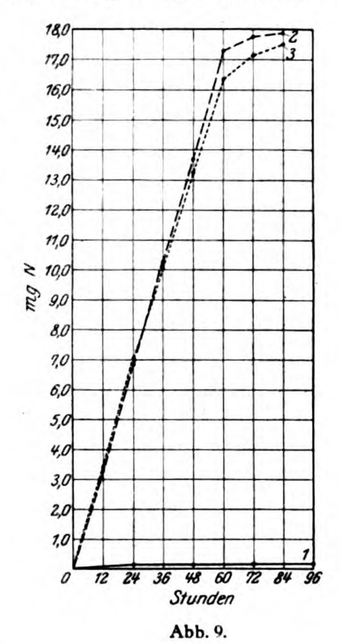


Abb. 9.

Versuch IV.

Die *gleichen* Versuche wurden nochmals mit *größeren* Mengen angestellt. Zu diesem Zwecke wurden entsprechend größere Hülsen und ähnlich konstruierte größere Glasgefäße verwendet.

100 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. als Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Pferdefibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm	3. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000	0,000
12	—	3,3952	3,392
24	0,028	3,328	3,336
36	—	3,458	3,208
48	0,0216	3,430	3,038
60	—	3,416	3,052
		Fibrin verschwunden!	
72	0,028	0,560	0,890
84	—	0,014	0,224
96	0,014	0,000	0,014
Gesamtabbau:	0,0916 mg N = 0,53 Proz.	17,6012 mg N = 99,89 Proz.	17,154 mg N = 99,50 Proz.

Wiederholung.

100 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Pferdefibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm	3. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000	0,000
12	—	3,234	3,122
24	0,028	2,996	2,842
36	—	2,870	2,772
48	0,0216	2,604	2,338
60	—	2,100	1,998
72	0,028	1,708	1,596
84	—	1,228	1,022
		Fibrin verschwunden!	
96	0,014	0,364	0,462
108	—	0,014	0,014
120	0,000	0,000	0,000
Gesamtabbau:	0,0916 mg N = 0,52 Proz.	17,178 mg N = 97,44 Proz.	16,266 mg N = 94,37 Proz.

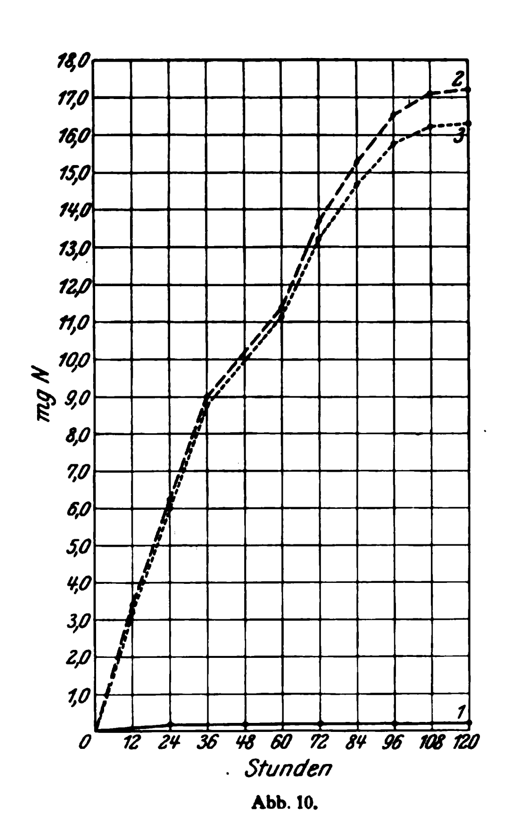


Abb. 10.

Bei dieser Anordnung hält sich der Abbau des artfremden Fibrins viel länger ziemlich konstant, bis das Fibrin vollständig abgebaut worden ist. Die geringfügigen Ergebnisse nach Verschwinden des Fibrins rühren wohl daher, daß der letzte Rest der dialysablen Abbauprodukte aus der Hülse nach außen wandert.

Auch diese Versuchsanordnung wurde mit übereinstimmendem Ergebnis mehrmals wiederholt.

Aus diesen beiden Versuchsreihen ist zu ersehen, daß das Abbauvermögen des Serums artfremden Substanzen gegenüber vom Quantum des Serums abhängig ist, woraus der Schluß zu ziehen ist, daß das Ferment entweder ebenfalls in die Außenflüssigkeit dialysiert oder im Laufe des Versuchs unwirksam wird.

Vor allem mußte daran gedacht werden, daß mit den hemmenden inzwischen vielleicht Stoffe wegdialysiert wurden — Salze, Proferment —, die für das Fortschreiten des Abbaues von Bedeutung sind. In einer besonderen Versuchsreihe (V) wurde deshalb der Einfluß von Salzlösungen auf Eiweiß untersucht. Zu diesem Zwecke wurden aus getrocknetem, löslichem Hühnereiweiß (*Kahlbaum*) — 0,1 g enthält [illegible]434 mg N —, Lösungen mit sterilem Aqua dest., mit steriler physiologischer Kochsalzlösung, steriler Ringerlösung und mit steriler Normosallösung (Sächsisches Serumwerk, Dresden) in Stärke von 5 Proz. hergestellt.

Zu diesem Zwecke wurden je 5 g Hühnereiweiß, das 4 Stunden bei 110° C im Trockenschrank sterilisiert worden war — die Löslichkeit wurde dadurch nicht beeinträchtigt —, mit der betreffenden Flüssigkeit auf 100 ccm aufgefüllt und 1 Stunde im Schüttelapparat geschüttelt. Das Ergebnis waren schwach opalisierende Lösungen. Diese Flüssigkeiten wurden dialysiert, alle 24 Stunden wurde die Außenflüssigkeit entfernt und durch 30 ccm frische Flüssigkeit ersetzt.

Versuch V.

[illegible]5 ccm 5proz. Hühnereiweißlösung in Aqua dest. in der Hülse, 30 ccm Aqua dest. als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
48	0,000
96	0,0014
Gesamtabbau:	0,0014 mg N = 0,004 Proz.

2. 5 ccm 5proz. Hühnereiweißlösung mit 0,85proz. NaCl-Lösung i
Hülse, 30 ccm 0,85proz. NaCl-Lösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
24	0,168
48	0,336
96	0,504
Gesamtabbau:	0,908 mg N = 2,39 Proz.

3. 5 ccm 5proz. Hühnereiweißlösung mit Aqua dest. in der Hülse, 3
Ringerlösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
24	0,224
48	0,532
96	0,8064
Gesamtabbau:	1,5624 mg N = 4,05 Proz.

4. 5 ccm 5proz. Hühnereiweißlösung in Ringerlösung in der Hülse, 30
Ringerlösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
24	0,504
48	1,026
96	1,393
Gesamtabbau:	2,923 mg N = 7,58 Proz.

5. 5 ccm 5proz. Hühnereiweißlösung in Normosallösung in der Hü
30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
24	0,518
48	1,064
96	1,456
Gesamtabbau:	3,038 mg N = 7,87 Proz.

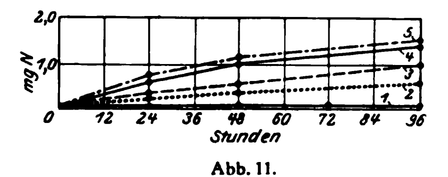


Abb. 11.

Daraus ergibt sich, daß der Elektrolytgehalt der Flüssigkeit beim Abbau von Eiweiß von Wichtigkeit ist. Ein kleiner Teil des kolloiden Eiweißstickstoffs wird durch die Salze *ohne* Fermenteinwirkung dialysabel. Ringer- und Normosallösung sind dabei gleichwertig. Im Höchstfalle wurden etwa 7,5 Proz. des vorhandenen Eiweiß-N dialysabel.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden auf die Fibrinolyse übertragen.

Um den Einfluß des Elektrolytgehalts auf den fermentativen Abbau der Fibrine im Pferdeserum zu untersuchen, wurden die *gleichen Versuche* (Pferdeserum + Fibrin in Hülse gegen Außenflüssigkeit dialysiert) nochmals vorgenommen, nur wurden als Außenflüssigkeit Ringer- oder Normosallösung verwendet. Die Außenflüssigkeit wurde alle 12 Stunden entfernt und durch frische ersetzt.

Versuch VI.

100 ccm Pferdeserum + 0,2 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Ringerlösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000
12	3,102	3,388
24	3,346	3,759
36	3,633	4,144
48	3,976	4,544
60	4,410	4,956
72	4,794	5,530
84	5,180	5,670
96	5,628	2,891
	Fibrin verschwunden!	
Gesamtabbau:	34,07 mg N	34,88 mg N

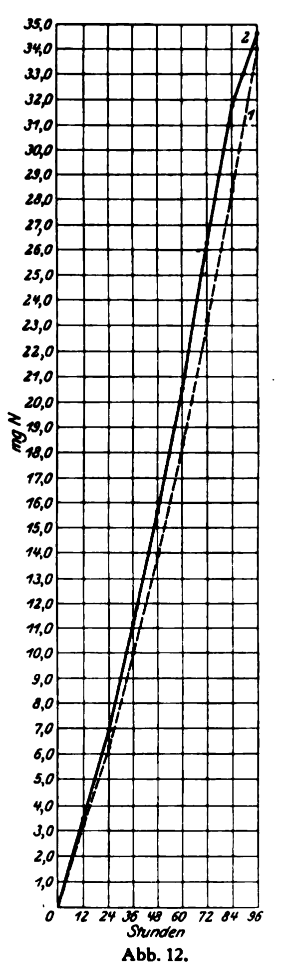


Abb. 12.

Bis zum Verschwinden des Fibrins sind 85 bis 87 Proz. des Eiweiß-N dialysabel geworden gegen 7,5 Proz. bei der bloßen Salzdialyse.

Die Versuche zeigen, daß der Abbautiter konstant ansteigt, bis das gesamte Fibrin abgebaut ist. Da Normosallösung nach Angaben des Sächsischen Serumwerkes außer den Bestandteilen der Ringer-

lösung noch Mono- und Diphosphate enthält, sich also dem Geha
Serums an anorganischen Bestandteilen besser anpaßt, wurden Pa
versuche mit Normosallösung gemacht.

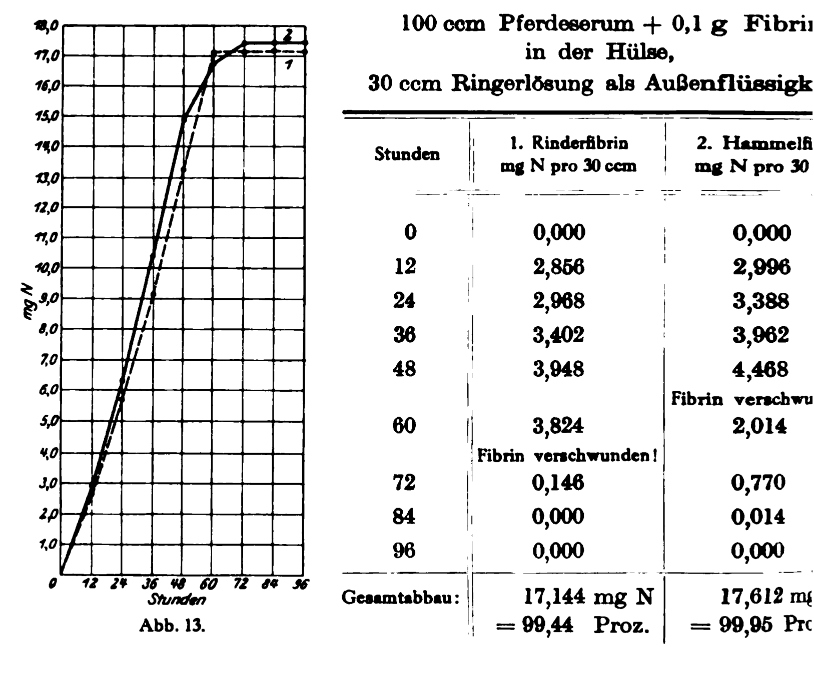


Abb. 13.

100 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibri
in der Hülse,
30 ccm Ringerlösung als Außenflüssigk

Stunden	1. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfi mg N pro 30
0	0,000	0,000
12	2,856	2,996
24	2,968	3,388
36	3,402	3,962
48	3,948	4,468
		Fibrin verschwu
60	3,824	2,014
	Fibrin verschwunden!	
72	0,146	0,770
84	0,000	0,014
96	0,000	0,000
Gesamtabbau:	17,144 mg N = 99,44 Proz.	17,612 m = 99,95 Pr

100 ccm Pferdeserum + 0,2 g Fibrin in der Hülse, 30 ccm Normosallös
als Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000
12	3,498	3,752
24	3,500	3,920
36	3,720	4,364
48	4,270	4,8104
60	4,438	5,208
72	4,788	5,866
84	5,300	6,384
	Fibrin verschwunden!	
96	4,936	0,350
Gesamtabbau:	34,450 mg N = 99,83 Proz.	34,658 mg N = 98,35 Proz.

Dieser Versuch gab bei mehrmaliger Wiederholung die gleichen Resultate. Es zeigt sich bei Verwendung von Normallösung eine geringe Abbaubeschleunigung gegenüber Ringerlösung.

100 ccm Pferdeserum + 0,1 g Fibrin in der Hülse. 30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	1. Rinderfibrin mg N pro 30 ccm	2. Hammelfibrin mg N pro 30 ccm
0	0,000	0,000
12	3,064	3,920
24	3,477	4,396
36	4,102	5,054
48	4,914	3,632
	Fibrin verschwunden!	
60	1,484	0,140
72	0,014	0,014
84	0,000	0,000
Gesamtabbau:	17,055 mg N = 98,97 Proz.	17,156 mg N = 97,37 Proz.

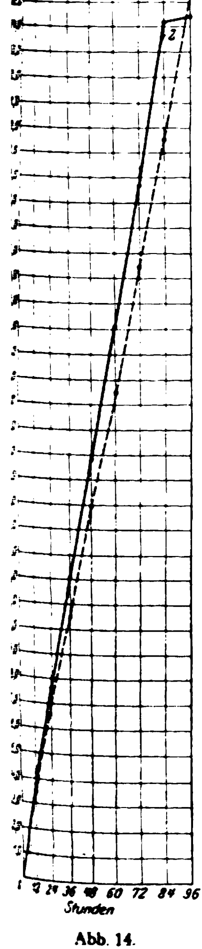


Abb. 14.

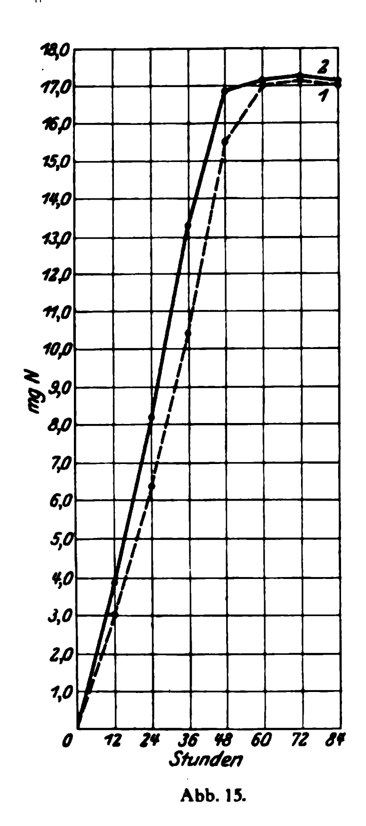


Abb. 15.

Aus diesen gesamten Abbauversuchen ist zu schließen, daß
1. Serum artfremdes Fibrin abbaut,
2. die Schnelligkeit des Abbaues davon abhängt, ob
   a) die Abbauprodukte rasch fortgeschafft werden,
   b) der Elektrolytgehalt des Serums konstant bleibt.

Aus Versuch VI geht hervor, daß mit dem Fortschreiten der Rea der Abbau ein immer schnelleres Tempo annimmt. Es kann da: weder an einer Auflockerung des Fibrins oder an einer Konzentra steigerung des Ferments liegen. Zwischen diesen Möglichkeiten n sich entscheiden lassen, wenn in einem bestimmten Stadium des suchs das angedaute Fibrin entfernt und durch frisches ersetzt w Mit der gleichen Versuchsanordnung mußte sich die Frage p lassen, ob für jedes artfremde Fibrin ein besonderes Ferment zunehmen ist, oder ob immer dasselbe alle Fibrine abbaut. War näı die obengenannte Vermutung unzutreffend, d. h. wird frisch zugefi Fibrin mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut wie angebaute konnte ein Wechsel der artfremden Fibrine vorgenommen weı Erfuhr dabei das Abbautempo keine Veränderung, so war Einheit keit des Ferments anzunehmen.

Versuch VII.

Wie sich der hemmende Einfluß der Abbauprodukte durch Dia verringern läßt, so läßt er sich verstärken. Es wurden 10 ccm Außenflüssigkeit, die laut Mikrokjeldahl 3,64 mg N in 30 ccm enthi zur Innenflüssigkeit zugesetzt, wonach die Abbautätigkeit des Ser sofort fast gänzlich aufhörte.

a) 100 ccm Pferdeserum + 0,2 g Hammelfibrin in der Hülse, 30 cc Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
12	3,640
Zusatz von 10 ccm Außenflüssigkeit!	
24	0,112
36	0,028
48	0,000

Abb. 16.

b) 100 ccm **Rinderserum + 0,2 g Pferdefibrin in der Hülse, 30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.**

Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000
12	3,252
24	3,752
Zusatz von 10 ccm Außenflüssigkeit mit 1,25 mg N	
36	0,602
48	0,028
60	0,000

Abb. 17.

Versuch VIII.

Pferdeserum wurde zunächst mit Hammelfibrin in den Dialysierschlauch gebracht und gegen Normosallösung dialysiert, wobei alle 12 Stunden die Außenflüssigkeit sorgfältig entfernt wurde. Nach Erreichung einer bestimmten „Abbauhöhe" wurde das Hammelfibrin durch scharfes Zentrifugieren von dem Pferdeserum getrennt und entfernt, das Serum weiter dialysiert, bis die darin enthaltenen Abbauprodukte des Hammelfibrins auf ein Minimum gesunken waren, sodann Rinderfibrin zugesetzt und gleichfalls gegen Normosallösung dialysiert, die alle 12 Stunden entfernt wurde. Nach Erreichung einer bestimmten Abbaustärke wurde dieses Rinderfibrin auf gleiche Art wie vorher das Hammelfibrin aus dem Pferdeserum entfernt und dieses weiter dialysiert, bis der N-Gehalt der 12stündig ausgewechselten Außenflüssigkeit ein Minimum erreichte. Sodann wurde dem Pferdeserum zum zweiten Male frisches Hammelfibrin zugesetzt und wiederum gegen 12stündig ausgewechselte Normosallösung dialysiert.

100 ccm Pferdeserum + 0,2 g Hammelfibrin in der Hülse, 30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm	Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000	96	3,640
12	3,360	108	3,710
24	3,846	120	4,440
36	4,220	Entfernung des Rinderfibrins!	
48	4,780	132	1,200
Entfernung des Hammelfibrins!		144	0,145
60	0,460	Zusatz v. 0,2 g frischen Hammelfibri[n!]	
72	0,140	156	5,160
Zusatz von 0,2 g Rinderfibrin!		168	5,830
84	3,420	180	6,640

100 ccm Rinderserum + 0,2 g Pferdefibrin in der Hülse, 30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm	Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000	96	3,136
12	3,108	108	3,514
24	3,976	120	4,172
36	4,564	Entfernung des Hammelfibrins!	
48	4,942	132	1,228
Entfernung des Pferdefibrins!		144	0,280
60	1,176	Zusatz von 0,2 g frischen Pferdefibrins	
72	0,364	156	5,460
Zusatz von 0,2 g Hammelfibrin!		168	6,174
84	2,842	180	6,888

Der Abbau des Hammelfibrins beginnt mit einer Geschwindigkeit die 3,360 mg N in 12 Stunden liefert, und steigt bis 4,780 mg N vo der 36. bis 48. Stunde. Das Fibrin wird nun entfernt. Nach im ganze 144 Stunden wird frisches Hammelfibrin zugesetzt und mit einer noc etwas größeren, sich sogar noch weiter steigernden Geschwindigkei angegriffen. Das Fibrin erfährt also wahrscheinlich im Verlauf de Abbaues keine vorläufige Veränderung, die es für dessen spätere Stadie zugänglicher macht. Zwischen diese beiden Etappen wurde ein Versuc mit Rinderfibrin geschoben. Hier findet der Abbau nicht mit de beim Hammelfibrin bereits erreichten, sodern mit einer kleinere Geschwindigkeit statt, mit der auch der des Hammelfibrins begonne hatte. In Berührung mit Hammelfibrin ist also im Serum ein Ferment angereichert, das *spezifisch* auf Hammelfibrin eingestellt ist und au Rinderfibrin keinerlei Einfluß hat.

Um die Deutung des Abbaues als Fermentvorgang zu stützen, wurde steriles Pferdeserum eine halbe Stunde im Wasserbad auf 58° C

gehalten und darauf mit Hammelfibrin im Dialysierschlauch gegen Normosallösung dialysiert.

Versuch IX.

5 ccm Pferdeserum + 0,1 g Hammelfibrin in der Hülse, 30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm
48	0,0014
96	0,002

Die Reaktion ist zweifellos an einen thermolabilen Körper gebunden. Zur Prüfung, welcher Bestandteil des Ferments thermolabil ist, wurde Serum mit Hammelfibrin gegen Normosallösung dialysiert, nach Erreichung einer bestimmten Abbauhöhe das Serumfibringemisch eine halbe Stunde im Wasserbad auf 58° C gehalten, nach Konstatierung des Aufhörens des Abbaues frisches Serum zugesetzt.

Versuch X.

100 ccm Pferdeserum + 0,2 g Hammelfibrin in der Hülse, 30 ccm Normosallösung als Außenflüssigkeit.

Stunden	mg N pro 30 ccm	Stunden	mg N pro 30 ccm
0	0,000	48	1,040
12	3,358	60	0,140
24	3,826	Zusatz von 50 ccm frischen Serums!	
36	4,243	72	4,114
Inaktivierung des Gemisches!		84	4,725

Auf Grund der beschriebenen, sämtlich durch Parallelversuche und mehrfache Kontrollen auf Exaktheit und Sterilität geprüften Ergebnisse lassen sich folgende Schlüsse zu den fermentativen Vorgängen im Blute ziehen: Das Serum von Pferd, Hammel und Rind enthält ein Ferment, das die Fibrine der anderen Blutarten, nicht aber arteigenes Fibrin abbaut. An sich kommt der Abbau bald zum Stehen, dagegen wird er in seinem Tempo beschleunigt, wenn man Sorge trägt, die entstehenden Spaltstücke dauernd durch Dialyse zu entfernen.

Fügt man im Laufe des Versuchs neues Substrat hinzu, so wird dieses sogar nicht nur mit der geringen Anfangsgeschwindigkeit, sondern mit der im Gange des Versuchs erreichten abgebaut. Da man sich kaum vorstellen kann, daß sich im Laufe des Versuchs die äußeren Bedingungen so durchgreifend verbessern, ist es wohl das Ungezwungenste, an eine Zunahme der aktiven Fermentmenge zu denken.

Wir kennen eine ganze Reihe von Beispielen, in denen Ferme
erst am Orte ihrer Tätigkeit oder im Augenblick, in dem sie diese a
nehmen müssen, aus einer unwirksamen Vorstufe frei gemacht werd
Diesen Mechanismus treffen wir auch bei dem besterforschten Ferm
des Plasmas, dem Thrombin, das erst im Augenblick der Gerinnu
aus dem Thrombogen gebildet wird.

Es liegt nahe, diesen Mechanismus auch für das fibrinabbauen
Ferment anzunehmen, wobei es einstweilen unentschieden bleil
muß, ob schon die Vorstufe des fibrinabbauenden Ferments spezifi
differenziert oder allen Fibrinasen gemeinsam ist.

Die Ähnlichkeit des fibrinabbauenden Ferments mit dem Throml
geht noch weiter. Zur Überführung von Prothrombin in Thrombin
die Gegenwart von Ca-Salzen unerläßlich, während allerdings
fertige Thrombin seine Gerinnung veranlassende Wirkung auch ol
Gegenwart von Ca-Salzen ausüben kann. Bei dem fibrinabbauend
Ferment ist die Gegenwart der Plasmasalze — es ist noch nicht gepr
worden, ob nur ein einzelnes der Plasmaionen oder ihre Gesamth
erforderlich ist — ebenfalls von ausschlaggebender Bedeutung.
Versuch IV, in dem zum Unterschied von Versuch III 100 ccm Ser
statt 5 ccm gegen die gleiche Menge Außenflüssigkeit dialysiert wurd
ist die Wirkung des vorhandenen Ferments geraume Zeit weiter g
gangen, wenn sie auch nicht die gleiche Intensität erreichte wie b
Dialyse gegen Ringerlösung. Beide Versuche zusammen liefern al
das Ergebnis, daß die Fermentwirkung bei allmählicher Herabsetzu
der Salzkonzentration sich abschwächt und bei gänzlichem Verlu
der Salze aufhört.

Zusammenfassung.

Fasse ich alle diese Ergebnisse nochmals zusammen, so ergibt si
folgendes:

1. Serum baut arteigenes Fibrin weder in vitro noch im Dialysi
schlauch ab.

2. Serum baut artfremdes Fibrin ab.

a) In vitro, wo die Spaltprodukte nicht entfernt werden, ste
der Abbau zunächst langsam an und kommt in dem Auge
blick zum Stehen, wo durch Anreicherung der Abbauproduk
ein Reaktionsgleichgewicht erreicht ist.

b) Schafft man durch Dialyse gegen destilliertes Wasser d
Abbauprodukte fort, so steigt die Abbaugeschwindigk
rascher an, schließlich hört aber der Abbau lange vor E
schöpfung der Substratmenge auf.

c) Dialysiert man nicht gegen Aqua dest., sondern gegen eine Lösung, die die Salzkonzentration des Serums möglichst unverändert hält, so erreicht der Abbau ein noch höheres Niveau und geht bis zum gänzlichen Verbrauch des Substrats weiter.

3. Eiweiß gibt in Berührung mit Neutralsalzlösungen von der ungefähren Konzentration des Plasmas langsam dialysable N-haltige Produkte ab. Die dabei frei werdenden Mengen sind viel geringer als die bei fermentativem Abbau entstehenden.

4. Den einzelnen Fibrinarten werden vom Serum spezifische Fibrinasen entgegengestellt. Es ist möglich, aber nicht sicher, daß diese von einer gemeinsamen unspezifischen Vorstufe ausgehen.

5. Serum, das eine halbe Stunde bei 56° C gehalten wird, hat sein Abbauvermögen verloren.

Zum Schluß erfülle ich die mir durchaus angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. *Schmitz* für die weitgehende Unterstützung und Mitwirkung bei meiner Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Über die Abhängigkeit der alkoholischen Gärung von der Wasserstoffionenkonzentration. IV.

Von

Erik Hägglund und **Anne Marie Augustsson.**

(Aus dem chemischen Institut der Akademie zu Åbo, Finnland.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

In der vorhergehenden dritten Mitteilung wurde die Frage de Geschwindigkeit des Zuckerzerfalls in saurer und alkalischer Lösun behandelt. Aus dieser Untersuchung geht hervor, daß das Enzym oder die Enzyme, welche die Gärung einleiten, ein außerordentlich *breites* Optimum-p_H haben. In der Tat zerfällt der Zucker ebens schnell bei einer Wasserstoffionenkonzentration entsprechend $p_H = 4$, wie bei einer solchen entsprechend $p_H = 8$. Gewisse Enzyme aber, die eventuell in den Zuckerabbau eingreifen, zeigen mehr oder wenige scharfe Optima. Erwähnung verdient in erster Linie die Phosphatese die nach *Euler* bei $p_H = 6{,}4$ ihre größte Wirksamkeit zeigt. Sofern nun der Zuckerabbau unbedingt mit einer Phosphorylierung als Vor stufe verknüpft ist, führt das, wie der eine von uns früher hervor gehoben hat, zu eigenartigen Konsequenzen, die wir aber einstweile nicht ablehnen möchten.

Untersuchungen von *Neuberg* und Mitarbeitern[1]) und solch von *Josephson* und *Euler*[2]) haben ergeben, daß die sogenannte Aldehyd mutase schneller in alkalischer Lösung als in saurer wirkt. Die Reak tionsgeschwindigkeit war allerdings so klein, daß nach Ansicht de letztgenannten Verfasser wenigstens bei solchen Aldehyden wie Acet aldehyd die Reaktion für den Verlauf der normalen Gärung wahr scheinlich nur von untergeordneter Bedeutung sein muß. Möglich wäre jedoch, daß die Aldehydmutase, wie früher auch angenomme worden ist, im Methylglyoxal, und zwar in der Form, wie es be der Gärung auftritt, ihr wichtigstes Substrat besitzt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 96, 192, 1919.
[2]) H. 135, 49, 1924.

Über die Abhängigkeit der Brenztraubensäuregärung von der Wasserstoffionenkonzentration liegen, soweit bekannt, nur einige wenige Versuche von *Euler* und *Karlsson*[1]) vor. Daraus geht hervor, daß die Kohlensäureentwicklung unter Einwirkung einer coenzymfreien Unterhefe (Trockenhefe) bei $p_H = 4,5$ bis $5,5$ am stärksten war. Es zeigte sich ferner, daß die enzymatische Tätigkeit bei dem Neutralpunkt sehr stark abgeschwächt war, so daß die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung hier nur etwa ein Zehntel von derjenigen bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration war. Sicherlich wird aber, je weiter man sich dem neutralen bzw. alkalischen Gebiet nähert, mehr und mehr Kohlensäure von der Lösung zurückgehalten. Groß kann aber die betreffende Kohlensäureentwicklung in dem *Euler*schen Versuch nicht gewesen sein, da die Wasserstoffionenkonzentration nach 6 Stunden Gärung bei einem Anfangswert entsprechend $p_H = 7,1$ unverändert geblieben war.

Aus älteren Versuchen von *Zerner*[2]) geht hervor, daß bei längerer Gärungsdauer mit anfänglich neutraler Kaliumpyruvinatlösung zum Schluß eine relativ starke Gärung eintrat. Bei Anwesenheit von Sulfit aber wurde diese Gärung unterdrückt. Messungen der Wasserstoffionenkonzentration wurden aber nicht vorgenommen, so daß man nicht weiß, bei welcher Acidität die Gärung letzten Endes erfolgte. Aus Versuchen von *Neuberg* und *Reinfurth*[3]), die sich als erste mit der Vergärung von Brenztraubensäure in Gegenwart von Sulfit befaßt haben, geht nicht hervor, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration die Vergärung der Brenztraubensäure geschah. Aus diesen Versuchen geht ferner nicht hervor, mit welcher Geschwindigkeit die Brenztraubensäure im Vergleich mit *Zucker* vergoren wurde. Offenbar war die Geschwindigkeit nicht groß, denn bei verhältnismäßig großen Hefemengen waren in vielen Fällen nach einer Zeit von mehreren Tagen noch beträchtliche Mengen Brenztraubensäure unvergoren. Andererseits ist behauptet worden, daß die Brenztraubensäure wesentlich schneller als Zucker vergoren wird. Über die Wirkung der Carboxylase besteht also trotz vieler Untersuchungen noch große Unklarheit. Aus diesem Grunde haben wir eine große Anzahl von Gärversuchen von Brenztraubensäure unter verschiedenen Bedingungen ausgeführt. Aus den Versuchsprotokollen entnehmen wir folgende Versuchsreihen.

Wir benutzten zunächst dieselbe Versuchsanordnung wie bei unseren früheren Arbeiten. Die entwickelte Kohlensäure wurde volumetrisch gemessen; in vielen Fällen wurde zur völligen Austreibung

---

[1]) Diese Zeitschr. **130**, 553, 1922.

[2]) Ber. **53**, 330, 1920.

[3]) Diese Zeitschr. **89**, 413, 1918; Ber. **52**, 1689, 1919; Ber. **53**, 462 u. 1039, 1921.

der Kohlensäure 10proz. Schwefelsäure zugesetzt. Die Tempera der Gärung betrug durchweg genau 30°. Die Messung der Wasserst ionenkonzentration von Brenztraubensäurelösungen mit der üblic elektrometrischen Methode ist schwierig. Wir benutzten deshalb Kontrolle die Indikatorenmethode, wobei die H˙-Konzentration Vergleichslösungen gegebenenfalls elektrometrisch bestimmt wurde

A. Lebende Hefe. Oberhefe.

I. (Abb. 1).

0,23 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen [1]).

1 g Hefe R. 20 ccm Lösung in jedem der Versuche I—VI.

Versuchsreihe 1.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
		Kohlensäure in Kubikzentimetern.				
Nach ½ Std.	0	4,5	7,6	10,9	11,6	13,
„ 1 „	0	2,4	5,3	7,2	8,3	9,
„ 1½ „	0	1,5	3,5	5,0	6,2	6,
„ 2 „	0	1,0	2,6	3,7	4,5	4,
		Relative Geschwindigkeit.				
Nach ½ Std.	0	35	58	84	89	100
„ 1 „	0	26	57	77	89	100
„ 1½ „	0	22	52	75	93	100
„ 2 „	0	20	53	76	92	100
	p_H					
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,4	3,9	3,2	2,7	2,2	1,7

Versuchsreihe 2.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
		Kohlensäure in Kubikzentimetern.				
Nach ½ Std.	0	4,4	7,5	10,0	12,0	13,7
„ 1 „	0	2,6	5,1	7,0	8,3	9,1
„ 1½ „	0	1,8	3,6	5,4	6,1	6,9
„ 2 „	0	1,0	2,6	3,8	4,7	5,2
		Relative Geschwindigkeit.				
Nach ½ Std.	0	32	55	73	88	100
„ 1 „	0	29	56	77	91	100
„ 1½ „	0	26	52	78	88	100
„ 2 „	0	19	50	73	90	100
	p_H					
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,4	3,9	3,2	2,7	2,2	1,7

[1]) Die Brenztraubensäure in der Konzentration von 0,23 mol. wurd mit Natronlauge so weit abgestumpft, daß die angegebenen Wasserstoff ionenkonzentrationen erhalten wurden.

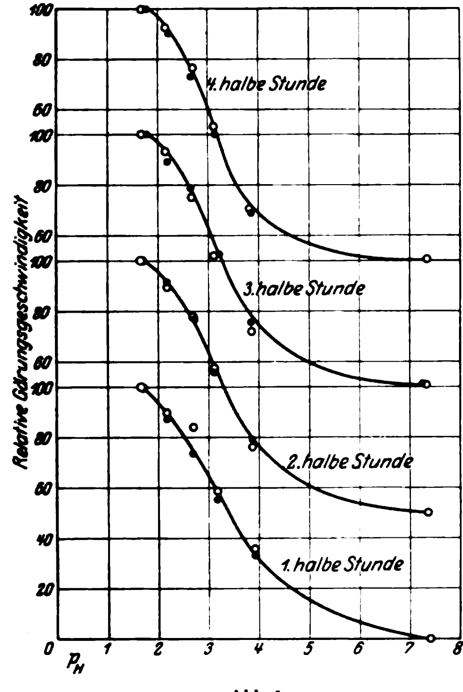


Abb. 1.

II. (Abb. 2.)

0,3 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen.

2 g Hefe R. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 3.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
Nach 1/2 Std.	0,4	7,5	19,5	25,0	18,2	13,8
„ 1 „	0	4,0	10,1	12,0	5,1	2,0
„ 1 1/2 „	0	2,3	6,4	8,0	2,7	0,6
„ 2 „	0	1,7	3,2	5,8	1,6	0,5
Relative Geschwindigkeit.						
Nach 1/2 Std.	2	30	78	100	73	55
„ 1 „	0	34	84	100	43	17
„ 1 1/2 „	0	29	80	100	34	8
„ 2 „	0	30	55	100	28	9
p_H						
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,4	4,1	3,6	3,0	2,0	1,6

Versuchsreihe 4.

Zeit	I	II	III	IV	V
Kohlensäure in Kubikzentimetern.					
Nach $^1/_2$ Std.	0,6	7,5	20,7	25,0	19,2
„ 1 „	0	3,8	10,1	12,6	5,0
„ $1^1/_2$ „	0	2,4	5,4	8,6	2,8
„ 2 „	0	1,5	3,3	5,4	1,8
Relative Geschwindigkeit.					
Nach $^1/_2$ Std.	3	30	83	100	77
„ 1 „	0	30	80	100	40
„ $1^1/_2$ „	0	28	63	100	33
„ 2 „	0	28	61	100	34
	p_H				
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,4	4,1	3,6	3,0	2,0

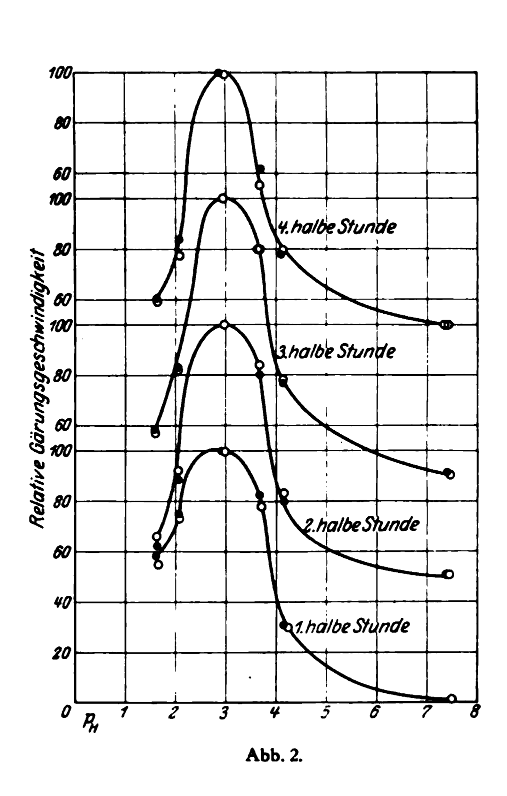


Abb. 2.

III. (Abb. 3.)

0,15 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösung.

1 g Hefe R. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 5.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
½ Std.	1,0	5,1	7,8	10,2	12,3	14,5
1 „	0	2,7	4,6	7,2	8,3	9,6
1½ „	0	2,0	3,6	5,0	6,3	6,6
2 „	0	0,8	2,5	3,3	4,5	4,8
Relative Geschwindigkeit.						
½ Std.	7	35	54	71	85	100
1 „	0	28	48	75	87	100
1½ „	0	31	54	76	97	100
2 „	0	17	52	69	94	100
p_H						
[illegible]dität nach 2 Std. Gärung	7,9	4,8	3,7	2,8	2,5	1,9

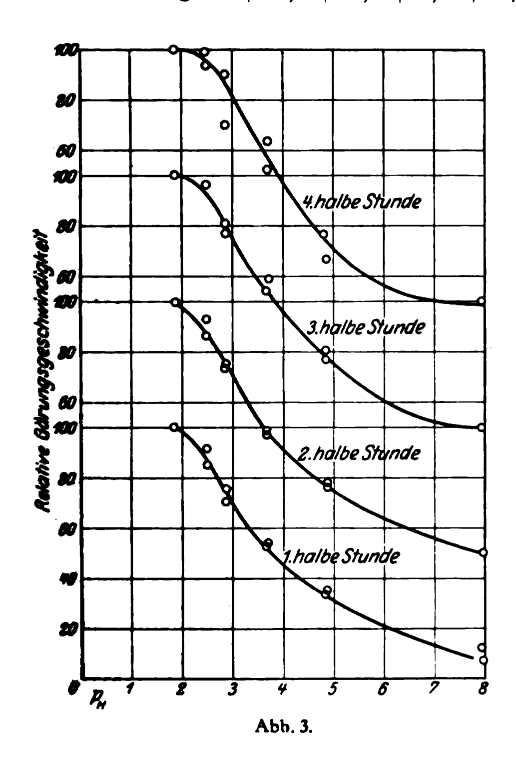


Abb. 3.

Versuchsreihe 6.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
			Kohlensäure in Kubikzentimetern.			
Nach $^1/_2$ Std.	1,4	4,1	6,5	9,3	11,2	12,3
„ 1 „	0	2,4	4,2	6,3	7,7	8,3
„ $1^1/_2$ „	0	1,5	3,3	4,5	5,4	5,[illegible]
„ 2 „	0	1,0	2,4	3,4	3,8	3,8
			Relative Geschwindigkeit.			
Nach $^1/_2$ Std.	12	34	53	76	91	100
„ 1 „	0	29	51	76	93	100
„ $1^1/_2$ „	0	27	59	81	97	100
„ 2 „	0	27	63	90	100	100
	p_H					
Acidität nach 2 Std. Gärung	7,9	4,8	3,7	2,8	2,5	1,9

IV.

0,144 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösung mit 0,1 mol. Na-Phospha puffer.

2 g Hefe R. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 7.

Lösungen	Zeit in Stunden									
	1	2	3	4	8	23,5	29,5	31,5	34,5	47,5
				Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
I	0	0	0	0	0	0	3,8	5,5	8,8	15,4
II	0	0	0	0	0	1,1	7,2	8,7	11,5	17,0
III	1,0	1,0	1,2	1,2	1,7	3,0	6,5	7,8	10,0	14,0
VI	3,9	4,1	4,6	5,0	6,0	9,2	12,7	13,5	—	—
V	13,0	17,8	21,0	21,6	23,5	25,2	27,2	—	—	—
VI	29,4	42,4	49,9	53,6	61,0	66,5	69,2	—	—	—

p_H

	I	II	III	VI	V	VI
Acidität vor der Gärung	8,3	7,0	6,1	5,1	2,0	1,2
„ nach „ „	7,2	6,8	6,4	5,9	4,8	3,6

V.

Um festzustellen, ob überhaupt eine Kohlensäureentwicklung i schwach saurem, neutralem oder alkalischem Gebiet eintritt, wurde folgende Versuche ausgeführt. Lösung: 0,2 mol. Brenztraubensäur Na-pyruvinat mit 0,15 mol. Phosphat.

Versuchsreihe 8.

50 ccm Lösung, 4 g frische Oberhefe H. 3 Stdn. Gärung.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure ccm
Versuch a	8,1	7,8	4,5
„ b	7,8	7,7	4,5
„ c	5,5	5,6	5,5

Versuchsreihe 9.

25 ccm Lösung, 2 g frische Oberhefe H. 3 Stdn. Gärung.

Versuch a	8,1	7,8	3,0
„ b	7,8	7,7	3,0
„ c	5,5	5,6	3,5

Es ergibt sich aus diesen Versuchen mit aller Deutlichkeit, daß lebende *Oberhefe* bei neutraler und alkalischer Reaktion Brenztraubensäure nicht oder ganz unwesentlich zerlegt. In verdünnter Lösung der Säure ist die optimale Wirkung stark nach der sauren Seite verschoben. In konzentrierteren Lösungen, wie 0,3 mol., ist die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung mit der größten Gärtätigkeit geringer. Das zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit des Brenztraubensäurezerfalls bei der Gärung mit *lebender Hefe* außer von der Wasserstoffionenkonzentration auch von der absoluten Menge der Säure abhängig ist. Da die Säure innerhalb der Hefezelle vergoren wird, ist die Gärungsgeschwindigkeit gegebenenfalls von der Diffusionsgeschwindigkeit der Säure abhängig. Mit anderen Worten: Die Wasserstoffionenkonzentration richtet sich *innerhalb* der Zelle, die letzten Endes maßgebend ist, nach der Säurekonzentration außerhalb derselben. Fraglich ist, ob das *Salz* die Zellenwand der lebenden Zelle durchdringt. Auf Grund unserer weiter unten mitgeteilten Untersuchungen über die Vergärung mit Trockenhefe erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die Vergärung der neutralen oder schwach alkalischen Pyruvinatlösungen mit lebender Hefe zum großen Teile deshalb nicht eintritt, weil die Zellenwand für das Salz *nicht* oder *ungenügend permeabel* ist. Bei *sehr langer* Versuchsdauer, wie in der Versuchsreihe 7, tritt bei alkalischer oder neutraler Reaktion eine geringe Kohlensäureentwicklung ein.

Die oben erwähnten Ergebnisse werden von den folgenden Versuchen mit *Unterhefe A* bestätigt. Die Unterhefe zeigt deutlich eine größere Empfindlichkeit für Brenztraubensäure als die Oberhefe R. Im neutralen oder schwach alkalischen Gebiet tritt eine, wenn auch *sehr schwache* Kohlensäureentwicklung ein.

B. Lebende Hefe. Unterhefe.

I. (Abb. 4.)

0,3 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen.

2 g Hefe. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 1.

Zeit	I	II	III	IV	V	[illegible]
		Kohlensäure in Kubikzentimetern.				
Nach ½ Std.	4,3	13,2	11,5	4,8	3,1	2
„ 1 „	2,1	5,1	1,3	0,5	0,4	0
„ 1½ „	1,3	3,0	0,6	0,3	0,1	0
„ 2 „	1,2	2,0	0,3	0	0	0
		Relative Geschwindigkeit.				
Nach ½ Std.	33	100	87	37	24	2[illegible]
„ 1 „	41	100	26	10	8	[illegible]
„ 1½ „	43	100	20	10	4	[illegible]
„ 2 „	60	100	15	0	0	[illegible]
	p_H					
Acidität nach 2 Std. Gärung . .	7,95	4,8	2,9	1,9	1,8	1,[illegible]

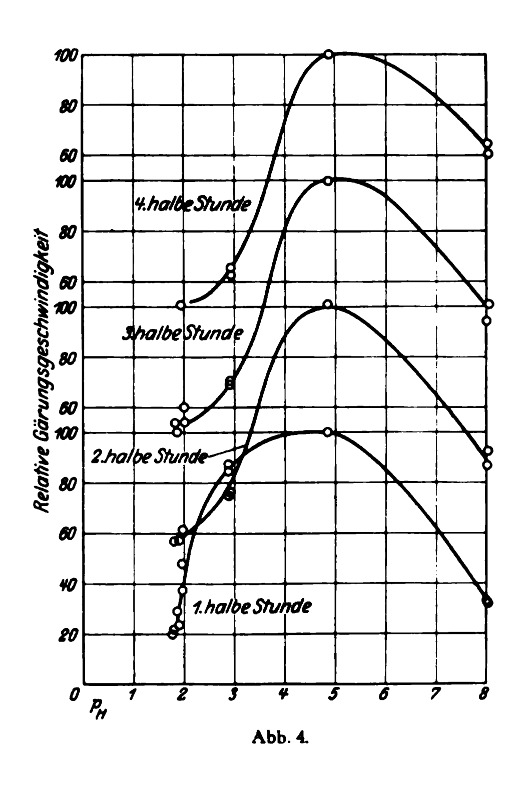


Abb. 4.

Versuchsreihe 2.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
			Kohlensäure in Kubikzentimetern.			
1/2 Std.	4,1	13,4	11,3	5,4	3,8	2,9
1 „	1,6	4,5	1,1	0,5	0,3	0,3
1 1/2 „	1,4	2,8	0,5	0,1	0	0
2 „	1,1	1,7	0,2	0	0	0
			Relative Geschwindigkeit.			
1/2 Std.	31	100	85	48	29	22
1 „	36	100	25	11	7	7
1 1/2 „	50	100	18	4	0	0
2 „	65	100	12	0	0	0
	p_H					
[illegible]it nach 2 Std. Gärung	8,0	4,8	2,9	1,9	1,8	1,7

II. (Abb. 5.)

0,15 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösung.

2 g Hefe. 20 ccm Lösung,

Versuchsreihe 3.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
			Kohlensäure in Kubikzentimetern.			
1/2 Std.	2,8	7,1	14,0	15,6	13,3	9,4
1 „	0,8	2,3	4,0	7,0	2,5	0,8
1 1/2 „	0,7	1,8	2,0	3,7	0,5	0,2
2 „	0,6	0,6	1,2	2,3	0	0
			Relative Geschwindigkeit.			
1/2 Std.	18	46	90	100	86	61
1 „	12	33	57	100	36	12
1 1/2 „	19	49	54	100	14	6
2 „	26	26	52	100	0	0
	p_H					
[illegible]it nach 2 Std. Gärung	8,2	5,2	3,9	2,6	2,1	1,7

Versuchsreihe 4.

1 g Hefe. 20 ccm Lösung.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
			Kohlensäure in Kubikzentimetern.			
1/2 Std.	1,4	6,3	8,8	8,8	7,0	5,4
1 „	0,5	2,8	3,6	1,1	0,4	0,3
1 1/2 „	0,2	1,5	2,2	0,4	0,1	0
2 „	0,2	0,9	1,6	0	0	0

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
			Relative Geschwindigkeit.			
Nach $^1/_2$ Std.	16	72	100	100	80	62
„ 1 „	14	78	100	31	11	9
„ $1^1/_2$ „	9	68	100	18	5	0
„ 2 „	13	56	100	0	0	0
			p_H			
Acidität nach 2 Stdn. Gärung .	8,2	5,2	3,9	2,6	2,1	1,

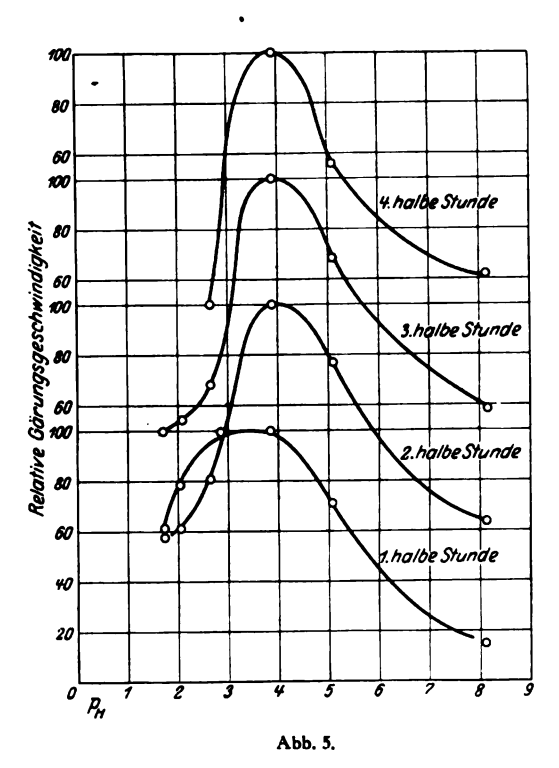


Abb. 5.

Die in den folgenden Versuchsreihen verwendeten Trockhefen bereiteten wir aus den in den oben erwähnten Versuch benutzten Hefen, Oberhefe R und Unterhefe A, durch Trockn bei gewöhnlicher Temperatur. Die Trockenhefe wurde nachher f zerrieben.

C. Trockenhefe aus Oberhefe.

I. (Abb. 6.)

mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen mit 0,15 mol. Phosphatpufferlösung.

1 g Hefe aus Oberhefe R. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 1.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
½ Std.	1,8	4,2	17,0	12,6	3,6	3,6
1 „	1,0	2,8	9,0	10,0	1,8	1,2
1½ „	0	1,4	6,6	7,3	2,6	1,2
2 „	0	1,4	1,8	5,8	1,0	0,7
Relative Geschwindigkeit.						
½ Std.	11	23	100	74	21	21
1 „	10	28	90	100	18	12
1½ „	0	19	90	100	35	16
2 „	0	24	31	100	17	12
p_H						
unmittelbar nach Hefezusatz	7,9	7,3	6,2	4,3	2,6	2,2
nach 2 Stunden Gärung	7,1	7,3	7,6	6,9	3,3	2,5
Mittelzahl während der Gärung	7,5	7,3	6,9	5,6	3,0	2,4

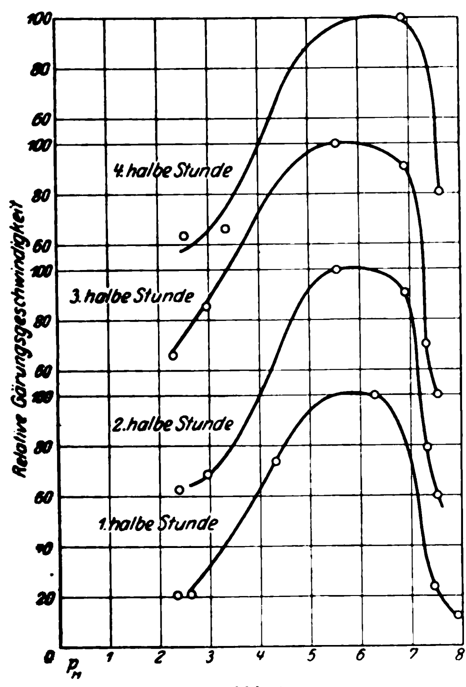


Abb. 6.

II. (Abb. 7.)

0,2 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen mit 0,15 mol. Phosphatpuffer

1 g Glucose. 1 g Hefe aus Oberhefe R. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 2.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
Nach ½ Std.	4,7	7,5	21,1	17,3	4,7	3,6
„ 1 „	3,2	6,0	14,5	15,8	2,3	1,6
„ 1½ „	2,9	4,2	10,1	13,8	2,6	1,8
„ 2 „	2,6	3,0	5,0	12,0	3,7	2,2
Relative Geschwindigkeit.						
Nach ½ Std.	22	36	100	82	22	17
„ 1 „	20	38	92	100	15	10
„ 1½ „	21	30	73	100	19	13
„ 1 „	22	25	41	100	31	18
p_H						
Acidität der Lösungen: unmittelbar nach Hefezusatz	7,9	7,4	6,2	4,3	2,6	2,2
nach 2 Stunden Gärung	7,6	7,6	7,3	6,5	3,1	2,3
Mittelzahl während der Gärung	7,8	7,5	6,8	5,4	2,9	2,3

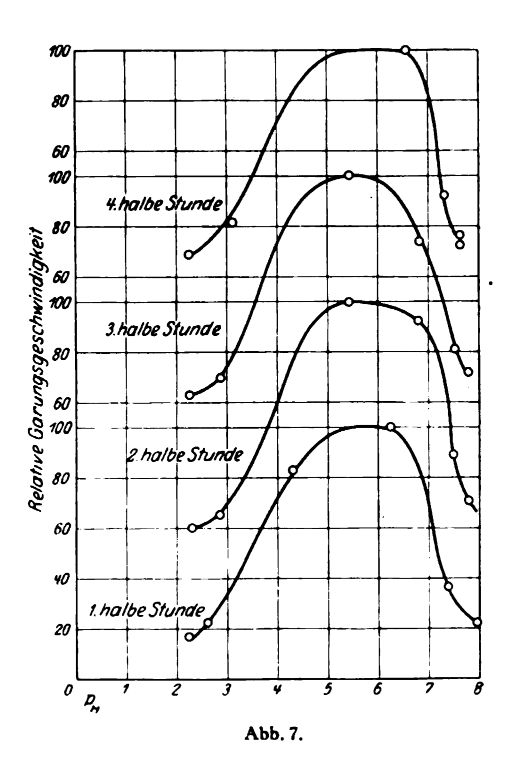


Abb. 7.

Vergleichen wir die Resultate der beiden oben erwähnten Versuche mit den entsprechenden, bei welchen frische Oberhefe benutzt wurde, so ergibt sich, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Gärung hier bei wesentlich geringerer Wasserstoffionenkonzentration vor sich geht. In der Tat ist diese Konzentration genau dieselbe wie die, welche als die günstigste für die Vergärung von *Zucker* mit Trockenhefe gilt. Auch bei neutraler bzw. schwach alkalischer Reaktion ist eine allerdings relativ *schwache* Kohlensäureentwicklung bemerkbar. Auf die Mengen kann man sich in diesem Gebiet, wie früher mehrfach betont wurde, nicht ganz verlassen, da Kohlensäure sicherlich zum Teil zurückgehalten wird.

Von großem Interesse war in diesem Zusammenhang zu erforschen, wie die Brenztraubensäuregärung in Anwesenheit von *Sulfit* vor sich geht. Es stellt sich aus der folgenden Versuchsreihe auffallenderweise heraus, daß das Sulfit in neutraler und alkalischer Lösung die Gärung vollständig zum Stillstand bringt. Wir kommen auf diese Sache in einem anderen Zusammenhang nochmals zurück.

III.

0,15 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen mit 0,15 mol. Phosphatpufferlösung und 0,15 mol. Na_2SO_3.

1 g Hefe aus Oberhefe R. 20 ccm Lösung.

Versuchsreihe 3.

Zeit	I	II	III	IV	V	H_2O
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
Nach 1 Std.	0	0	1,3	6,8	16,3	0,8
„ 2 „	0	0	0,7	4,6	6,6	1,0
„ 3 „	0	0	0,6	2,4	2,8	0,5
„ 4 „	0	0	0,5	2,2	2,8	0,3
„ 5 „	0	0	0,2	1,4	1,5	0
„ 24 „	3,6	6,5	11,4	—	—	17,0
p_H						
Acidität der Lösungen: unmittelbar nach Hefezusatz	8,0	7,2	6,0	4,9	4,0	—
nach 5 Std. Gärung	—	—	—	5,4	5,2	—
„ 24 „ „	6,0	5,3	5,6	5,6	5,4	6,3

Hier trat nach 24 Stunden Gärung eine so erhebliche Selbstgärung der Hefe ein, daß die Werte unbrauchbar wurden. Die Werte für die ersten 5 Stunden sind aber anwendbar.

Um zu sehen, wie groß die wahre Kohlensäureentwicklung bei alkalischer Reaktion im Vergleich mit derjenigen bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration ist, wurden die Versuche 4 bis 6 ausgeführt.

8*

IV.

Versuchsreihe 4.

0,25 mol. Brenztraubensäure-Natriumpyruvinatlösung mit 0,15 mol. Phosphatpuffer.

1 g Hefe. 25 ccm Lösung.

Nach 3 Stunden wurde die Kohlensäure mit 10proz. Schwefelsä ausgetrieben.

Kohlensäure in Kubikzentimetern.

I. (p_H = 8,2) nach 3 Stunden Gärung 36,3
II. (p_H = 6,2) „ 3 „ „ 86,5

Es stellt sich also heraus, daß die Brenztraubensäure zu ein nicht unwesentlichen Teile auch bei alkalischer Reaktion vergo wird. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklu nach 3 Stunden nur etwa 40 Proz. von der Geschwindigkeit bei ei Acidität entsprechend $p_H = 6,3$ (im Anfang der Gärung gemesse

Die folgenden Versuche wurden zur Kontrolle ausgeführt.

Versuchsreihe 5.

0,2 mol. Brenztraubensäure-Natriumpyruvinatlösung. 0,15 mol. Phosphatpuff

I.

2 g Trockenhefe aus Oberhefe H. 50 ccm Lösung.

Nach 2 Stunden Gärung wurde die Kohlensäure mit 10proz. Schwefe säure ausgetrieben. H'-Konzentration nach 2 Stunden. Gärung gemesse

a) p_H = 7,8 . . . . 23,7 ccm
b) p_H = 6,2 . . . . 72,3 „

Ohne Hefezusatz entstand aus den Lösungen keine Kohlensäure.

II.

2 g Trockenhefe aus Oberhefe R. 50 ccm Lösung.

2 Stunden Gärung. Die Kohlensäure wie oben mit Schwefelsäu ausgetrieben.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure ccm
Versuch a	7,9	7,9	—
„ b	7,4	7,7	57,7
„ c	5,4	7,1	83,5

III.

1 g Trockenhefe aus Oberhefe R, 25 ccm Lösung. 2 Stunden Gärung Sonst wie oben.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure ccm
Versuch a	7,9	7,9	26,3
„ b	7,4	7,6	36,4
„ c	5,4	7,1	51,7

Um zu sehen, wie sich die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung von Stunde zu Stunde änderte, wurde folgender Versuch unter gleichzeitiger Messung der Wasserstoffionenkenzentration ausgeführt:

Versuchsreihe 6.

0,25 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösung mit 0,15 mol. Phosphatpuffer.

1 g Hefe. 25 ccm Lösung. $p_H = 8,2$.

Nach 1, 2 und 3 Stunden wurden in den folgenden drei Gärversuchen nach beendeter Gärung 10proz. Schwefelsäure zugesetzt und die Kohlensäure ausgetrieben.

Kohlensäure in Kubikzentimetern.

Nach 1 Stunde Gärung	20,0
„ 2 Stunden „	25,1
„ 3 „ „	29,2
p_H vor der Gärung	8,2
p_H nach 1 Stunde Gärung	8,1
p_H „ 2 Stunden „	7,8
p_H „ 3 „ „	7,6

Das Ergebnis dieses Versuchs ist sehr interessant, denn daraus geht hervor, daß die Gärungsgeschwindigkeit gleich im Anfang mehrfach so groß ist wie später[1]). Wir werden diese Frage im Zusammenhang mit anderen Ergebnissen später diskutieren.

Folgender Versuch mit Trockenhefe aus Unterhefe A bestätigt zunächst, daß die Carboxylase die optimale Wirkung bei einer Acidität entsprechend $p_H = \sim 6$, ausübt.

D. Trockenhefe aus Unterhefe.

I. (Abb. 8.)

0,2 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen mit 0,15 mol. Phosphatpuffer.

1½ g Hefe aus Unterhefe A. 20 ccm Lösung.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
Nach ½ Std.	7,2	25,6	32,1	26,1	21,6	3,4
„ 1 „	4,2	7,6	16,3	21,8	18,6	0,2
„ 1½ „	2,0	2,5	5,0	7,5	10,6	0
„ 2 „	1,2	1,7	2,2	1,9	6,0	0

[1]) Vgl. hierzu *Neuberg* u. *Reinfurth*, Ber. 53. 1047 u. 1051, 1920.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
			Relative Geschwindigkeit.			
Nach $^1/_2$ Std.	22	77	100	79	66	10
„ 1 „	20	35	75	100	85	1
„ $1^1/_2$ „	19	23	47	71	100	0
„ 2 „	28	20	36	32	100	0
	p_H					
Acidität der Lösungen: unmittelbar nach Hefezusatz .	7,6	6,4	5,7	5,2	4,4	3,1
nach 2 Stunden Gärung . . .	7,9	7,3	7,1	6,8	6,7	3,3
Mittelzahl während der Gärung	7,7	6,8	6,4	6,0	5,5	3,2

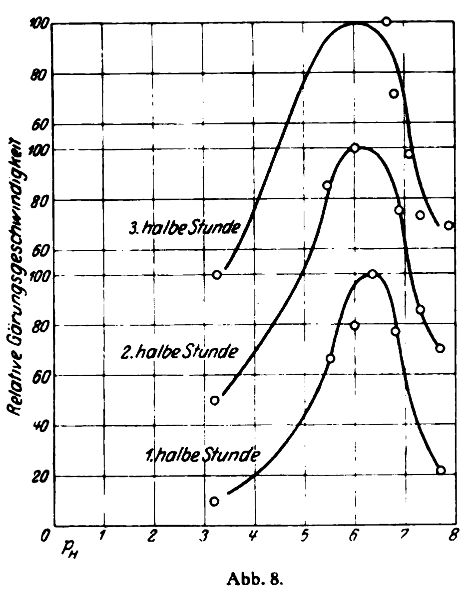


Abb. 8.

Um die Geschwindigkeit der Gärung von Brenztraubensäure- und von Zucker (Glucose) zu vergleichen, wurde die Gärungsmischung, die im vorhergehenden Versuch angewandt wurde, mit 0,5 Glucose versetzt. Die Gärungsgeschwindigkeit ist, wie wir sehen, bei Anwesenheit von Zucker wesentlich größer. Die Brenztraubensäure vergärt unter diesen Umständen zweifellos langsamer als Glucose, eine Tatsache, die allerdings nicht als Beweis gegen die Brenztraubensäuretheorie der Gärung angeführt werden kann, da, wie wir annehmen, die gärungshemmende Wirkung des Acetaldehyds wegen der momentan erfolgenden „gemischten Dismutation“ bei dem Zuckerabbau nicht erfolgen kann. Es steht aber fest, daß Brenztraubensäure unter den angeführten Bedingungen bei weitem nicht so schnell wie Glucose vergoren wird.

II. (Abb. 9.)

[illegible] mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen mit 0,15 mol. Phosphatpufferlösung und 0,5 g Glucose.

1½ g Hefe aus Unterhefe A. 20 ccm Lösung.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
[illegible] ½ Std.	8,9	45,5	43,0	33,7	18,0	3,5
„ 1 „	4,2	56,5	67,2	54,3	25,0	0,5
Relative Geschwindigkeit.						
[illegible] ½ Std.	20	100	95	74	40	8
„ 1 „	6	84	100	80	38	1
p_H						
[illegible] unmittelbar nach Hefezusatz	7,6	6,4	5,7	5,2	4,4	3,1
nach 1 Stunde Gärung	7,9	7,2	6,5	6,3	6,2	3,1
Mittelzahl während der Gärung	7,7	6,8	6,1	5,8	5,3	3,1

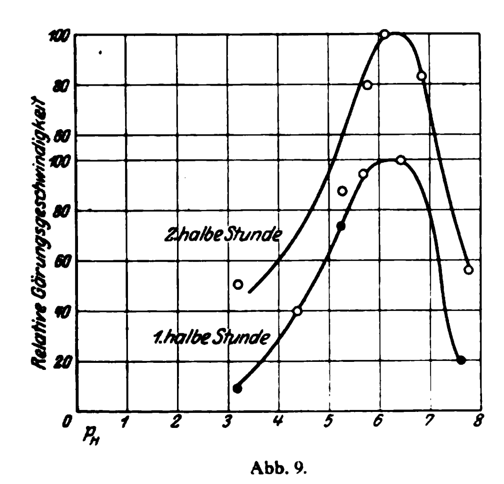


Abb. 9.

III.

Die Kohlensäurebildung wurde durch Austreibung mit 10proz. Schwefelsäure nach 2 Stunden Gärung festgestellt. 25 ccm Lösung, 1 g Trockenhefe aus Unterhefe S.

Vergärung von 0,2 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinat mit 0,15 mol. Phosphat.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure ccm
Versuch a	7,9	8,0	56,5
„ b	7,7	7,9	72,2
„ c	4,8	7,1	92,8

IV.

Vergärung von Brenztraubensäure in Anwesenheit von Sulfit.

Wir haben bereits oben festgestellt, daß die Brenztraubensä gärung in neutraler und schwach alkalischer Lösung in Anwesen von Sulfit bei Anwendung von Trockenhefe aus Oberhefe stark schwächt oder unterdrückt wird. Die Kohlensäureentwicklung bei diesen Versuchen schwer ganz exakt festzustellen. In Anlehn an Versuche von *Neuberg* und *Reinfurth* haben wir deshalb in die Zusammenhang die *Aldehydbildung* festgestellt. Für diesen Zw benutzten wir die Methode von *Neuberg*, um den Aldehyd aus Sulfitverbindung freizulegen und abzudestillieren. Die Bestimm des Aldehyds geschah im übrigen nach *Ripper*. Wir führen folge beiden Versuche an:

A.

0,2 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösung, enthaltend *0,15* n Phosphat und 0,2 mol. Na_2SO_3. Temperatur 30°.

500 ccm Lösung, 25 g Trockenhefe aus Unterhefe S. 6 Stunden Gäru

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Aldehyd in 100 ccm Lösung g
Versuch a	6,1	6,8	0,37
„ b	8,4	8,3	0,02

B.

Wie der vorhergehende Versuch mit dem Unterschied, daß die Gäru hier *26 Stunden* dauerte.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Aldehyd in 100 ccm Lösung g
Versuch a	6,1	7,2	0,40
„ b	8,4	7,3	0,02

Es ist also ganz deutlich, daß die Vergärung von Brenztraube säure im neutralen und alkalischen Gebiet in Anwesenheit von Sulf ***vollständig zum Stillstand kommt.*** Bei schwach saurer Reaktion ist i Anfang die Brenztraubensäuregärung recht kräftig, aber ***in dem Maß wie dadurch die Wasserstoffionenkonzentration abnimmt, hört die Gärun auf***, wie aus einem Vergleich zwischen den beiden Versuchen A und hervorgeht.

Wir führen auch einige Versuche an, bei welchen wir nach be kannter Vorschrift aus der Oberhefe R Acetonhefe herstellten und di Brenztraubensäuregärung dieser Hefe untersuchten.

Folgender Versuch bestätigt die früher erhaltenen Resultate mi Trockenhefe.

E. Acetonhefe aus Oberhefe R.

I. (Abb. 10.)

mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösungen mit 0,15 mol. Phosphatpuffer.

1½ g Hefe. 20 ccm Lösung.

Zeit	I	II	III	IV	V	VI
Kohlensäure in Kubikzentimetern.						
nach ½ Std.	6,0	19,7	27,7	20,6	3,4	3,5
1 "	1,7	10,3	12,0	13,1	0,5	0,5
1½ "	1,4	5,0	6,1	9,8	0	0
2 "	0,3	2,0	1,5	7,3	0	0
Relative Geschwindigkeit.						
nach ½ Std.	22	71	100	74	12	12
1 "	13	79	91	100	4	4
1½ "	13	51	62	100	0	0
2 "	4	27	21	100	0	0
p_H						
unmittelbar nach Hefezusatz	7,4	6,4	6,0	5,3	2,9	2,5
nach 2 Stunden Gärung	7,4	7,2	7,0	6,8	3,3	2,5
Mittelzahl während der Gärung	7,4	6,8	6,5	6,0	3,1	2,5

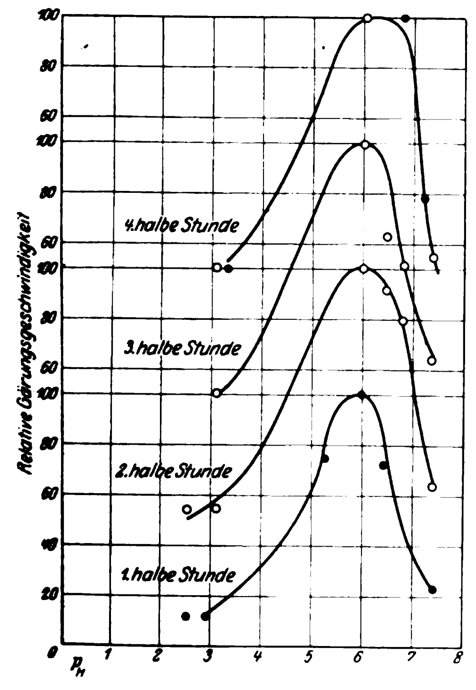


Abb. 10.

Wir untersuchten auch die Brenztraubensäuregärung mit Acet hefe in Anwesenheit von Sulfit bei verschiedener Wasserstoffion konzentration des Substrats. Das Resultat ist, wie aus folgen Tabelle hervorgeht, dasselbe wie bei unseren obenerwähnten Versuch In neutraler bzw. schwach alkalischer Reaktion ist keine Kohlensäu entwicklung bemerkbar.

II.

0,15 mol. Brenztraubensäure-Na-pyruvinatlösung mit 0,15 mol. Phosphatpu und 0,15 mol. Na_2SO_3.

1 g Hefe. 20 ccm Lösung.

Kohlensäure in Kubikzentimetern.

Zeit	I	II	III	IV	V	H_2
Nach 1 Std.	0	0	2,8	11,5	21,2	0
„ 2 „	0	0	0,5	3,8	5,2	0
„ 3 „	0	0	0,5	2,2	2,4	0
„ 16 „	4,4	7,9	9,8	17,6	18,4	18
	p_H					
Acidität der Lösungen: unmittelbar nach Hefezusatz .	8,0	7,2	6,0	4,9	4,0	—
Acidität der Lösungen: nach der Gärung	5,8	5,6	5,6	5,7	5,8	6

Bei einer Gärdauer von 16 Stunden ist die Selbstgärung so heblich, daß die Werte unbrauchbar werden. Ein Vergleich ist ab in den ersten 3 Stunden erlaubt, weil während dieser Zeit keine Selbs gärung eintritt.

F. Hefeextrakt aus Unterhefe S.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse bilden den Anfang einer umfan reicheren Untersuchung über die Gärungsgeschwindigkeit bei A wendung von *Hefeextrakt.* Die Resultate dieser Untersuchung werd wir in einer folgenden Mitteilung bekanntmachen. Hier werden zwei Ve suchsreihen über die Vergärung von Brenztraubensäure in mit Phosph gepufferten Lösungen angeführt.

Den Hefeextrakt bereiteten wir nach der Vorschrift von *Lebedew* aus unserer Unterhefe S.

Versuchsreihe 1.

25 ccm einer Lösung von 0,2 mol. Brenztraubensäure-Natriumpyruvin mit 0,15 mol. Phosphat, 20 ccm Hefeextrakt, 0,2 ccm Toluol. Gärungsze 2 Stunden. Temperatur 30,0°.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure mit H_2SO_4 ausgetrieben ccm
Versuch a	6,6	7,2	40,7
„ b	6,3	7,1	44.0
„ c	5,3	6,5	75,1

[1]) Literatur bei *Euler-Lindner*, Chemie der Hefe usw., S. 88. Leipzig 191

Versuchsreihe 2.

Die Gärmischung hatte dieselbe Zusammensetzung wie in der vorhergehenden Versuchsreihe. Die Lösungen waren in zwei Fällen gleich im Anfang der Gärung alkalisch. In dem Falle konnte auch keine Kohlensäureentwicklung nachgewiesen werden. Zeit der Gärung 3 Stunden, Temperatur 30,0°.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure mit H_2SO_4 ausgetrieben ccm
Versuch a	7,6	7,6	0
„ b	7,4	7,4	0
„ c	6,5	7,0	8,7

Versuchsreihe 3.

Die Gärmischung wie in der Versuchsreihe 1, die Aciditäten aber etwas anders gewählt. Gärungszeit 3 Stunden. Temperatur 30,0°.

	p_H vor der Gärung	p_H nach der Gärung	Kohlensäure mit H_2SO_4 ausgetrieben ccm
Versuch a	7,6	7,4	3,8
„ b	6,7	7,0	6,2
„ c	5,5	6,8	60,7

Aus diesen Versuchsreihen ergibt sich deutlich, daß *die Brenztraubensäuregärung bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion praktisch vollkommen zum Stillstand gebracht wird. Die Carboxylase wird offenbar in ihrer Wirkung bei neutraler bzw. schwach alkalischer Reaktion inaktiviert.*

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Daß, wie wir festgestellt haben, lebende Hefe, insbesondere Oberhefe, Brenztraubensäure nur bei sehr hoher Wasserstoffionenkonzentration des Gärungssubstrats vergärt, beruht offenbar darauf, daß die betreffende Säure relativ langsam in die Zellen eindringt. Die Zellenwände der Unterhefe sind, wie es scheint, leichter zu durchdringen. Durch das Trocknen der Hefe werden die Permeabilitätsverhältnisse geändert. Die günstigste Wasserstoffionenkonzentration für die Wirkung der Carboxylase ist hier dieselbe wie die Optimumkonzentration der Wasserstoffionen bei der Zuckervergärung. Auch in neutraler und alkalischer Lösung wird Brenztraubensäure von Trockenhefe, wenn

auch mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit als bei dem Optimum-
zerlegt.

Bei der Vergärung von Brenztraubensäure in Pufferlösungen m
Hefeextrakt nach *Lebedew* zeigte sich auffallenderweise, daß die Gärun
im alkalischen Gebiet vom Neutralpunkt ab praktisch aufhört, währe
bei $p_H = 6$ die Gärung sehr stark ist. Daraus geht zunächst herv
daß die Wirkung der Trockenhefe eine andere ist, als freigeleg
„Zymase". Wir nehmen einstweilen an, daß die Wasserstoffione
konzentration im Innern der Zellen eine andere, und zwar größere
in der umgebenden Lösung ist.

Es steht auf alle Fälle fest, daß die Carboxylase bei $p_H = 6$ ei
scharf ausgeprägte Optimumwirkung zeigt. Wenn man sich von diese
Punkt dem alkalischen Gebiet nähert, fällt die p_H-Aktivitätskurve f
Carboxylase sehr steil.

Merkwürdig ist, daß die Brenztraubensäuresulfitverbindung b
$p_H > 7$ nicht zerlegt wird. Wir können nicht umhin, hervorzuhebe
daß diese Sache sowie unsere sonstigen Ergebnisse über die Zucke
und Brenztraubensäuregärung schwer mit der herrschenden Ansich
über den Mechanismus des Zuckerzerfalls bei der Gärung in Einklan
zu bringen ist. Wir wollen aber in diesem Stadium der Untersuchunge
keine endgültigen Behauptungen aufstellen. Auf diese Frage werde
wir aber gelegentlich zurückkommen. Wir möchten aber hervo
heben, daß die Vergärbarkeit der Brenztraubensäure eventuell davo
abhängig ist — ob die Säure in Keto- oder Enol-Form vorlieg
Henri und *Fromageot*[1]) haben auch kürzlich nachgewiesen, daß d
Verhältnis zwischen den beiden Formen von der Wasserstoffione
konzentration stark abhängig ist.

Wir haben ferner gesehen, daß die Gärung der Brenztraubensäu
gleich im ersten Moment wesentlich schneller verläuft als kurz darau
Offenbar ist der gebildete Acetaldehyd für die Carboxylasewirku
schädlich. Die Geschwindigkeit der Zuckervergärung aber ist, wie w
nachgewiesen haben, wenigstens für den größten Teil des Verlauf
konstant. Daß *Acetaldehyd* eine zentrale Stellung in dem enzymatische
Zuckerabbau einnimmt, bezweifeln wir keineswegs. Bei der Gärun
von Zucker, auch im alkalischen Gebiet, häuft sich bekanntlich kei
Aldehyd in wesentlichen Mengen an. Das läßt sich nach der Theor
von *Neuberg* einleuchtend erklären, wenn man annimmt, daß di
Aldehydmutase auf eine „gemischte Dismutation' eingestellt is
eine Reaktion, die mit großer Geschwindigkeit verläuft.

---

[1]) Bull. Soc. Chim. (4) 38, 845 (1925).

Brenztraubensäure wird nicht so schnell wie Zucker vergoren, ch bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration nicht. Sofern enztraubensäure wirklich ein Zwischenprodukt der Gärung ist, gt es nahe, zu folgern, daß bei der Zuckervergärung eine Anreicherung n Brenztraubensäure eintreten müßte. Das ist aber bis jetzt nicht obachtet worden. Daraus zu schließen, daß Brenztraubensäure s Zwischenprodukt der Gärung *nicht* auftritt, wäre verfrüht. Daß e Brenztraubensäure so langsam vergoren wird, kann auf die Bildung iftigen Acetaldehyds, wie wir bereits hervorgehoben haben, zurückführt werden.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Hitzeveränderungen des Albumins[1]).

Von

Mona Spiegel-Adolf.

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 19. Januar 1926.)

Von den mannigfachen Problemen chemischer und physikalisch chemischer Natur, welche die Erscheinung der Hitzeveränderung de Proteine der Untersuchung bietet, sollen hier nur, wie in einer frühere Mitteilung[2]), zwei Fragekomplexe Berücksichtigung finden: Di physikalisch-chemischen Veränderungen, welche das Eiweißmolekü unter dem Einfluß der erhöhten Temperatur erfährt und die Wirksam keit, die Säuren-, Laugen- und Salzzusätze auf diesen Vorgang ausüben

Die Art der Veränderung, welche Proteine unter der Einwirkung von hohen Temperaturen erleiden, war sowohl Gegenstand theoretische Betrachtungen als auch experimenteller Forschung. Doch haben di meisten der mit diesem Gegenstand sich beschäftigenden Autoren vo den zahlreichen Erklärungsmöglichkeiten abgesehen und das Problen der Hitzeveränderung in die Entscheidung der Alternativfrage verlegt ob das Wesentliche des Prozesses in einem Ringschluß mit Kondensatio oder in einer Hydrolyse besteht.

So haben *Hofmeister*, *Pauli* und *Robertson*[3]) die Meinung vertreten daß die Hitzedenaturierung, als deren wichtigstes Kriterium die ver minderte Löslichkeit der erhaltenen Produkte anzusprechen ist, auf einem Ringschluß der endständigen Gruppen beruhe, während andere Autoren der gegenteiligen Ansicht zuneigen, die Hitzeveränderung bedinge eine Hydrolyse innerer Bindungen des Eiweißmoleküls. Während nun *Chick*

---

[1]) Vorläufig mitgeteilt auf der IV. Hauptversammlung der Kolloid-Gesellschaft in Nürnberg, 5. bis 7. September 1925. Kolloid-Zeitschr. 38, 127, 1926.

[2]) *Mona Adolf*, Kolloidchem. Beih. **20**, 288, 1924; Kolloid-Zeitschr. 35, 342, 1924.

[3]) *T. B. Robertson*, Die physikalische Chemie der Proteine. Dresden, Steinkopff, 1912.

und *Martin*[1]) eine hydrolytische Spaltung des Eiweißes bei der Einwirkung von heißem Wasser mit Hilfe der *Sörensen*schen Formoltitration der Carboxylgruppen nicht nachweisen konnten, schließt *Lepeschkin*[2]) aus der Beschleunigung, die die Hitzedenaturierung am Eialbumin durch Säurezusatz, der zur Bildung von Acidalbumin nicht hinreicht, erfährt, daß die Denaturierung eine Hydrolyse sei. Verfasserin[3]) hat nun in einer physikalisch-chemischen Untersuchung am Globulin wahrscheinlich gemacht, daß Hitzeveränderung nur möglich sei, wenn die endständigen Amino- und Carboxylgruppen nicht mit Säure oder Lauge verbunden sind, und auf die Übereinstimmung dieses Verhaltens mit der Annahme der Hitzeveränderung, als wesentlich durch einen Ringschluß der endständigen Gruppen bedingt, verwiesen. Ferner hat *Sörensen*[4]) den Nachweis erbracht, daß die Hitzedenaturierung des Eialbumins ohne Stickstoffverlust, wohl aber mit Wasserabgabe verbunden sei. Schließlich fassen *Hsien* und *D. Y. Wu*[5]) die Hitzeveränderung als gleichen Vorgang auf wie die Denaturierung unter schwachem Säure- und Laugeneinfluß, beide auf Hydrolyse beruhend.

Die vorliegende Untersuchung bediente sich zur Feststellung der durch Hitzeeinwirkung am Albumin hervorgebrachten Veränderungen der gleichen, bereits am Globulin verwendeten Methodik. Es wurde also zunächst auf eine direkte Analyse des Denaturierungsvorganges verzichtet und versucht, durch physikalisch-chemische Untersuchung des hitzedenaturierten Albumins und Vergleich der so gewonnenen Daten mit den am genuinen Albumin anderweitig festgestellten Tatsachen indirekt die durch Temperatureinwirkung hervorgebrachten Veränderungen zu beleuchten[6]).

Über den Einfluß, den Säure-, Laugen- oder Neutralsalzgegenwart auf das Zustandekommen von Hitzeveränderungen des Albumins ausüben, gelten im allgemeinen die Ansichten, daß der Vorgang der Hitzeveränderung sich aus einer unter allen Umständen stattfindenden Denaturierung und einer fakultativ erfolgenden, vom Milieu abhängigen Koagulation zusammensetzt, so daß die betreffenden Zusätze wohl imstande seien, ein Zusammentreten, i. e. Koagulieren, der durch die Temperaturerhöhung denaturierten Eiweißteilchen zu verhindern, nicht aber den Prozeß der Denaturierung aufzuhalten. Die eingangs erwähnten Untersuchungen konnten diese Ergebnisse am Globulin nicht wiederfinden; ein direkter Vergleich der eigenen und der Angaben

---

[1]) *H. Chick* und *C. J. Martin*, Kolloidchem. Beih. **5**, 49, 1913; Journ. of Physiol. **40**, 404, 1910; **43**, 1, 1911; **45**, 61 und 261, 1912.

[2]) *W. Lepeschkin*, Kolloid-Zeitschr. **31**, 342, 1922; **32**, 42, 44 und 106, 1923.

[3]) l. c.

[4]) *M.* und *S. P. L. Sörensen*, C. r. d. trav. d. Lab. Carlsberg **15**, 1, 1925.

[5]) *Hsien* und *D. Y. Wu*, Journ. of biol. Chem. **64**, 369, 1925.

[6]) Die vorliegende Untersuchung wurde auf Anregung von Herrn Prof. *Wo. Pauli* ausgeführt.

der Literatur war aus dem Grunde nicht möglich, weil die letzter ausschließlich an wasserlöslichem Eiweißmaterial, Ser-, Ovalbum Hämoglobin usw. gewonnen worden waren. Um nun vergleichba Daten zu erhalten, wurden die hier mitgeteilten Versuche an Ser- u Ovalbumin ausgeführt. Schließlich wurden, um ein möglichst reic haltiges Untersuchungsmaterial zu gewinnen, die Versuche noch a einen weiteren physikalisch-chemisch genau analysierten Eiwei körper, das Casein, ausgedehnt.

Entsprechend der angegebenen Beschränkung der hier zu b handelnden Fragestellung wurde neben der bereits erwähnten phy kalisch-chemischen Methodik zur feineren Identifizierung der zu unte suchenden Eiweißprodukte auch Methoden der Immunbiologie hera gezogen.

I.

Bei der *Herstellung* des Untersuchungsmaterials an hitzegefällte Albumin mußten einige wesentliche Punkte berücksichtigt werde Die Versuchsanordnung sollte zunächst möglichst vollständige Hitz fällung bewirken, damit die Notwendigkeit vermieden wird, auf ein eventuelle Hitzefraktionierung des Albumins [vgl. *Halliburton*[1])] nähe einzugehen, und das genuine und das hitzeveränderte Produkt al vergleichbare Einheiten gegenübergestellt werden können. Da nu das Eintreten der Hitzefällung bekanntlich weitgehend von der Gegen wart von Elektrolyten abhängig erscheint und die letzteren nac eigenen Erfahrungen auch die Zusammensetzung des auftretende Koagulums beeinflussen, so erschien die *Cohnheim*sche[2]) Forderun zur Herbeiführung der Koagulation in löslichen Proteinen, dieselbe nur in nach gründlicher Dialyse salz- und alkalifrei gemachtem Zustand zu erhitzen, als durchaus berechtigt. Obwohl nun das Serumalbumi als in elektrolytfreier Lösung hitzefällbar bezeichnet wird, existie dennoch eine ganze Anzahl von Angaben in der Literatur, welche di Hitzekoagulationsfähigkeit von vollkommen reinen Albuminlösunge in Abrede stellen und die in den letzten Jahren besonders von *Lepesch kin*[3]) vertreten worden sind. Schließlich mußten auch die diesbezüg lichen Daten über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentratio für die Koagulation des Albumins berücksichtigt werden.

Nachdem bei der Herstellung von reinen Albuminlösungen i jedem Falle Dialyse, sei es nun zur Salzentziehung des ursprüngliche Mediums oder zur Beseitigung von zur Fällung dienenden Salzmenge

---

[1]) *W. D. Halliburton*, Journ. of Physiol. 5, 155; 8, 133, 1887.
[2]) *O. Cohnheim*, Chemie der Eiweißkörper. Braunschweig 1911.
[3]) l. c.

verwendet wird, so erschienen die Angaben von *Schmidt*[1]) und seinen Schülern *Aronstein*[2]), *Heynsius*[3]), *W. Kieseritzky*[4]) und *Al. Rosenberg*[5]), wonach dialysiertes Albumin beim Erhitzen nicht mehr koaguliere, gleichbedeutend mit der Aussage, daß möglichst salzfreie Lösungen von Seralbumin beim Kochen nicht gerinnen. Diese letztere Aussage findet sich z. B. im Lehrbuch von *O. Hammarsten* (1922).

Nun hat *Pauli*[6]) gezeigt, daß gut dialysiertes Serum zwischen 50 bis 60° C koaguliere, und ebenso durch Halbsättigung mit Ammonsulfat vom Globulin befreites.

Die obigen Angaben[7]) seien nur darauf zurückzuführen, daß infolge verschieden raschen Abwanderns von Anionen und Kationen es zu einem bestimmten Zeitpunkte im Verlauf einer jeden Dialyse von salzhaltigem Eiweiß zu einer alkalischen Reaktion kommt, bei welcher die Proteine nicht hitzekoagulabel sind. Nach weiterer Fortführung des Prozesses werden die Proteine wieder beim Erhitzen fällbar. Die Befunde der obigen Autoren und analoge von *Michaelis* und *Mostynski*[8]), die Koagulation erst nahe beim Siedepunkt feststellen konnten, werden durch frühzeitiges Abbrechen der Dialyse bei alkalischer Reaktion erklärt. Während nun *Sörensen* und *Jürgensen*[9]) diese Erklärung *Paulis* akzeptieren, glaubt *Lepeschkin*[10]) auf Grund eigener Versuche zu anderen Ergebnissen zu kommen. Dieser Autor, welcher angibt, daß die Hitzekoagulation der Albuminlösungen, die durch Dialyse von Salzen befreit sind, nicht gelingt, konnte zwar die Resultate von *Pauli* und *Wagner* reproduzieren. Er versucht jedoch, ihnen eine andere Deutung zu geben. Zunächst zieht dieser Autor die Berechtigung in Frage, Serum, dessen Leitfähigkeit derjenigen des destillierten Wassers entspricht, als praktisch salzfrei anzusprechen, da doch Salz an das Protein adsorbiert sein könne. Dabei übersieht *Lepeschkin* vollständig, daß in salzhaltigen Eiweißlösungen ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und nicht gebundenem Salze besteht, und daß bei fortdauernder Wegschaffung der letzteren durch Dialyse auch die Menge der gebundenen Salze stetig abnimmt. Nachdem also *Lepeschkin* die *Pauli*schen Sera trotz ihrer geringen Leitfähigkeit als salzhaltig anspricht und diesen hypothetischen Salzgehalt als Ursache der Koagulationsfähigkeit derselben angibt, muß er außerdem, um die Wirksamkeit so kleiner Salzmengen zu erklären, zu der Annahme einer durch nichts bewiesenen, angeblich durch die zu lange dauernde Dialyse bewirkten Modifikation der *Pauli*schen Proteine greifen. Diese Hypothese schien einer Nachprüfung bedürftig zu sein.

---

[1]) *Al. Schmidt*, Pflügers Arch. 8, 75, 1874.
[2]) *B. Aronstein*, ebendaselbst 8, 75, 1874.
[3]) *E. Heynsius*, ebendaselbst 9, 514, 1874.
[4]) *W. Kieseritzky*, Die Gerinnung usw. Dissertation Dorpat 1882.
[5]) *Al. Rosenberg*, Vergl. Unters. betr. d. Alkalialbuminat usw. Dissertation Dorpat 1883.
[6]) *Wo. Pauli*, Beitr. z. chem. Physiol. 10, 53, 1907.
[7]) Vgl. *Wo. Pauli* und *R. Wagner*, diese Zeitschr. 27, 296, 1910.
[8]) *L. Michaelis* und *B. Mostynski*, ebendaselbst 24, 79, 1910.
[9]) *S. P. L. Sörensen* und *E. Jürgensen*, diese Zeitschr. 31, 397, 1911.
[10]) l. c.

Für die vollständige Globulinbefreiung und Salzentziehung d zur Gewinnung von Albumin verwendeten Pferdeserums und Eierkl wurde in der vorliegenden Untersuchung früheren Erfahrungen e sprechend die anfängliche Dialyse im Faltendialysator mit der Elekt dialyse kombiniert. Es gelingt auf diese Weise, die von manch Autoren als mögliche Fehlerquelle beanstandete lange Dauer d Dialyse beträchtlich zu verringern. Die verwendete Methodik u die Eigenschaften der durch dieselben gewonnenen löslichen Protei sind in einer früheren Arbeit[1]) beschrieben worden. Leitfähigke H-Aktivität und Hitzekoagulationspunkt solcher Albuminlösung sind in Tabelle I enthalten.

Trotzdem nach dem oben Vorgebrachten die gemessene gerin Leitfähigkeit im Sinne einer weitgehenden Salzfreiheit der Albumi aufzufassen ist, wurde dennoch der Aschengehalt des Serumalbumi bestimmt. In gleicher Weise wie *Lepeschkin* seinen entsprechende Versuch ausführte und wie schon früher der Aschengehalt des Globuli festgestellt worden war, wurde das bei 100° C getrocknete Albumi ohne jeglichen Zusatz verascht und schwach geglüht. Der dabei e mittelte Rückstand betrug nur etwa 0,04 Proz. der Ausgangssubstan während das Albumin von *Lepeschkin* einen Aschengehalt von 3 Pro aufwies. Das auf die geschilderte Weise dargestellte Albumin dürft dem Ideal des salzfreien Eiweißes bereits recht nahe kommen. Di Berechtigung der Leitfähigkeitsbestimmung zum Nachweis der Salz freiheit von Eiweißlösungen erfährt damit eine experimentelle Be stätigung. Es dürfte somit durch die vorliegende Aschenbestimmun die Grundlage der *Lepeschkin*schen Annahme einer bei langdauernde Dialyse stattfindenden Modifikation des Eiweißes hinfällig geworde sein. Dem entspricht es auch, daß bei strikter Befolgung der vo *Pauli*[2]) gegebenen Richtlinien für eine einwandfreie Elektrolyse ei Albumin dargestellt werden konnte, dessen Identität mit dem u sprünglich im Serum vorhandenen, wie weiter unten berichtet werde wird, durch immunbiologische Methodik wahrscheinlich gemach werden konnte. Die vorliegenden Befunde sind danach, insofern di übrigen Versuchsbedingungen übereinstimmen, mit den Daten de Literatur über auf andere Weise dargestellte Albuminlösungen, dere Artspezifität erhalten blieb, vergleichbar.

Die meisten Hitzekoagulationsversuche sind jedoch, wie z. B. di eingehenden Experimente von *Chick* und *Martin*, an ammonsulfat haltigem Material gemacht worden, außerdem enthielt das Eialbumi nach den Angaben dieser Autoren freie Säure, so daß ganz beträchtlich

---

[1]) *M. Adolf* und *Wo. Pauli*, diese Zeitschr. **152**, 360, 1924.
[2]) *Wo. Pauli*, ebendaselbst **127**, 150, 1922.

Mengen von Alkali nötig waren, um die H-Konzentration des destillierten Wassers zu erreichen. Auch *Lepeschkin* arbeitete in Ammonsulfatgegenwart, während *Sörensen*[1]) in seiner letzten Mitteilung bei der Beschreibung eines Säureflockungsversuchs die Notwendigkeit betont, daß die zu untersuchende Eialbuminlösung so weitgehend als möglich von Salzen befreit sei. Die Versuchsresultate, die nicht nach diesem Prinzip gewonnen sind, wären mit den vorliegenden nur nach durchgeführtem Beweis vergleichbar, daß die anwesenden Elektrolyte weder die Eigenschaften des entstehenden Koagulats beeinflussen, noch in dasselbe chemisch gebunden eingehen. Darüber vergleiche die eingangs erwähnten früheren Mitteilungen.

Endlich muß noch die Reaktion der hier verwendeten Proteinlösungen besprochen werden, nachdem von *Michaelis*, *Rona*[2]), *Mostynski*[3]) und *H. Davidsohn*[4]) die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration der zu koagulierenden Proteine betont worden war.

Die meisten dieser Autoren geben übereinstimmend an, daß Protein vollständig nur bei saurer Reaktion koaguliere. Diese Angabe wurde von *Michaelis* und seinen Mitarbeitern dahin präzisiert, daß in nicht elektrolytfreiem Zustande hitzedenaturiertes Albumin nur bei nachheriger Pufferung auf isoelektrische Reaktion koaguliere. Nachdem *Pauli* und *Wagner* in den oben wiedergegebenen Ausführungen die Befunde von *Michaelis* und *Mostynski* im wesentlichen als durch Verwendung alkalisch reagierender Eiweißlösungen erklären, haben *Sörensen* und *Jürgensen* die Frage der Einwirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Koagulation von Eialbumin eingehend studiert. Sie deuten die auch von ihnen und später von *Chick* und *Martin* festgestellte Erscheinung, daß relativ große Salzsäuremengen zur Herbeiführung der Hitzefällung von Eialbumin erforderlich sind, in Übereinstimmung mit *Pauli* und *Wagner*, als notwendige Neutralisation der im Albumin enthaltenen alkalischen Salze. Die saure Reaktion der Eiweißlösungen, die am günstigsten für die Koagulation einer reinen Lösung erscheine, rühre hauptsächlich von der sauren Reaktion der Eiweißlösungen selbst her. Die ebenso von *Chick* und *Martin* bestätigte Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration bei der Koagulation wird durch die von der letzteren bewirkte Verminderung des löslichen Proteins erklärt.

Nachdem nun in einer Untersuchung mit *Wo. Pauli*[5]) gezeigt werden konnte, daß elektrodialytisch gereinigtes Ei- und Seralbumin tatsächlich eine geringe Wasserstoffionenkonzentration aufweist, so wurde solches Eiweiß ohne jeglichen Zusatz der Hitzeeinwirkung unterworfen.

Als Temperatur wurde, da ja nicht der Vorgang der Hitzedenaturierung untersucht, sondern möglichst vollständige Fällung des

---

[1]) l. c.
[2]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, diese Zeitschr. **27**, 38, 1910.
[3]) l. c.
[4]) *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*, diese Zeitschr. **30**, 142, 1910.
[5]) *M. Adolf* und *Wo. Pauli*, ebendaselbst **152**, 360, 1924.

Albumins angestrebt wurde, wegen ihrer physikalischen und biologischen Bedeutsamkeit und leichter Reproduzierbarkeit diejenige des siedenden Wassers gewählt, wie es schon unter anderen *Sörensen* und *Jürgensen* getan haben. Entsprechend den Angaben dieser Autoren, die durch fortlaufende Stickstoffbestimmungen im Koagulationsfiltrat die optimale Dauer des Erhitzens feststellen konnten, bei welcher das ganze Eiweiß gefällt wird, ohne daß es noch zu einem Abbau des Proteins durch die Einwirkung des siedenden Wassers kommt, wurde die Dauer der Einwirkung der Siedetemperatur in allen Fällen auf 15 Minuten festgesetzt. Nach den Untersuchungen von *Sörensen* und *Jürgensen* genügt diese Zeit nicht, um Eialbumin vollständig zur Gerinnung, d. h. auf Stickstoffkonstanz, zu bringen. Jedoch haben eben diese Forscher gezeigt, daß dem Prozeß der Hitzegerinnung beim Eialbumin sekundäre Prozesse hydrolytischer Natur parallel laufen. Es wurde daher auch beim Eialbumin keine längere Siededauer verwendet. Auf diese Weise wird auch der von *Michaelis* und *Rona*[1]) angegebenen Erscheinung (s. weiter unten), nach welcher je nach der Erhitzungsdauer eine primäre reversible und sekundäre irreversible Denaturierung zu unterscheiden ist, Rechnung getragen, da erstere bei der hier verwendeten Kochdauer restlos in die zweite übergehen müßte. Um die Entstehung allzu kompakter Koagula zu vermeiden und eine gleichmäßige Einwirkung der Temperatur auf das gesamte Protein zu gewährleisten, wurden P. S.-Albuminlösungen von relativ geringer Konzentration, i. e. 0,4 Proz., verwendet. Und da nach Angaben von *Lepeschkin* Eialbumin in verdünnteren Lösungen nicht mehr koaguliert, so wurde der Hitzegerinnungsversuch gleich in 2,4, 1,2, 0,6, 0,3 und 0,15 Proz. Eialbuminlösungen durchgeführt. Während der ganzen Versuchsdauer wurde die Flüssigkeit stark gerührt. SH_2-Entwicklung konnte in keinem Falle während des Erhitzens nachgewiesen werden.

Die entstehende dichte Trübung bildet in allen Fällen teilweise makroskopisch wahrnehmbare Niederschläge; die nach der Abkühlung erhaltenen Filtrate waren in allen Fällen mit Ausnahme der verdünntesten Eialbuminlösung, die schwache Opaleszenz zeigte, wasserklar und ließen keine Trübung auf Sulfosalicylsäurezusatz, noch bei weiterem Erhitzen erkennen. Die Biuretreaktion war jedoch nur im Filtrat des gekochten Seralbumins negativ. Dies schließt natürlich nicht aus, daß bei Verfeinerung der Methode die Anstellung der oben erwähnten Reaktionen im weitgehend eingedampften Filtrat oder bei Verwendung von immunspezifischen Reaktionen, z. B. der Präzipitinmethode, sich in vorliegendem Falle ebenso wie bei den ent-

---

[1]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, diese Zeitschr. **29**, 294, 1910.

sprechenden Versuchen *Zinssers*[1]) noch Spuren unkoagulierten Eiweißes nach dem Erhitzen nachweisen lassen. Für unseren Zweck konnte der erreichte Grad der Koagulation des Serumalbumins als vollständig aufgefaßt werden. Hingegen wies das wasserklare Filtrat der hitzegefällten Eialbuminlösung noch deutliche Biuretreaktion auf. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den eben erwähnten von *Sörensen* und *Jürgensen*, die namhafte Differenzen bei der Hitzegerinnung von Ser- und Ovalbumin konstatieren konnten, die sie jedoch nur auf Unterschiede der Geschwindigkeit beziehen, mit welchen die Hitzeveränderungen im Eiweißmolekül erfolgen.

Tabelle I.

		$K_{unkorr.}$	C_H	Aschengehalt Proz.
0,4proz. Pferdeserumalbumin	vor d. Erhitzen	$5{,}46 . 10^{-6}$	$5{,}30 . 10^{-6}$	0,04
	nach d. "	$7{,}33 . 10^{-6}$	$2{,}84 . 10^{-7}$ $2{,}71 . 10^{-7}$	
2,4proz. Eialbumin	vor d. Erhitzen	$1{,}097 . 10^{-5}$	$1{,}70 . 10^{-5}$	
	nach d. "	$1{,}85 . 10^{-5}$	$2{,}93 . 10^{-6}$ $3{,}57 . 10^{-6}$	

In den nach der Hitzegerinnung der Proteine gewonnenen Filtraten wurde ferner die Leitfähigkeit und die C_H bestimmt (vgl. Tabelle I). Durch Vergleich dieser Daten mit denjenigen der genuinen Albuminlösungen lassen sich folgende Tatsachen feststellen:

Die Leitfähigkeit des Filtrats erscheint in beiden Fällen gegenüber derjenigen der genuinen Eiweißlösungen erhöht, während, falls die Leitfähigkeit der ursprünglichen Lösung allein durch das Protein bedingt wäre und dasselbe bei der Koagulation, ohne weitere Veränderungen zu erleiden, ganz oder teilweise ausfallen würde, das entgegengesetzte Verhalten zu erwarten wäre. Es besteht jedoch ein quantitativer Unterschied zwischen der Leitfähigkeitszunahme der hitzegefällten Ser- und der entsprechenden Eialbuminlösung.

Ohne Mutmaßungen über den Ursprung der Leitfähigkeitszunahmen anstellen zu wollen, kann jedoch festgestellt werden, daß, falls diese im Sinne von *Lepeschkin* auf ein Freiwerden von ursprünglich adsorbierten Salzmengen zu beziehen sind, die Menge der letzteren beim Seralbumin $2 . 10^{-5}$ nicht übersteigen kann. Hingegen würde die größere Leitfähigkeitszunahme beim Eialbumin mit der vorhandenen Biuretreaktion im Filtrat und den von *Sörensen* und *Jürgensen* angenommenen sekundären hydrolytischen Veränderungen der erhitzten Lösungen zu vereinbaren sein. In gleichem Sinne scheinen auch die Ergebnisse der C_H-Messungen zu sprechen.

---

[1]) *H. Zinsser*, Journ. of Immunology **9**, 227, 1924.

In Übereinstimmung mit den oben angeführten Ansichten von *Sörensen* über den Ursprung der für die Hitzegerinnung optimalen C_H und den eigenen bereits erwähnten Befunden am Serumalbumin verschwinden die in Lösungen des letzteren nachweisbaren H-Ionen bei der Hitzegerinnung nahezu vollständig. Beim Eialbumin ist die C_H zwar vermindert, jedoch sind noch immer freie H-Ionen in merkbarer Menge vorhanden. Diese letzteren Messungen stehen auch quantitativ in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden *Sörensen*schen Werten.

Da somit an eine Verunreinigung des Niederschlages durch lösliche Beimengungen gedacht werden mußte, so wurde der Niederschlag auf dem Filter mit destilliertem Wasser gewaschen, bis letzteres keinen Leitfähigkeitsanstieg mehr aufwies, in warmer Luft auf paraffinierten, flachen Glasschalen getrocknet und in der Reibschale pulverisiert. Um etwaige, bei diesem Vorgang auftretende Veränderungen des Proteins eliminieren zu können, wurden die entsprechenden Versuche stets auch an nicht getrocknetem Material ausgeführt.

Es konnten keinerlei Verschiedenheiten im Verhalten solcher Proteine festgestellt werden. Da nun die weiteren Untersuchungen der hitzegefällten Proteine weitgehende Differenzen derselben ergaben, so werden im folgenden die an den verschiedenen Proteinen gewonnenen Ergebnisse zunächst getrennt besprochen werden.

II.

4 g eines solchen Pulvers von hitzedenaturiertem Albumin in 100 ccm Aqua dest. 10 Stunden hindurch geschüttelt, erhöhen die Leitfähigkeit des letzteren von $3 \cdot 10^{-6}$ auf $2 \cdot 10^{-5}$. Dabei zeigt die klare, filtrierte Flüssigkeit mit Sulfosalicylsäure und beim Erhitzen deutlich sichtbare Opaleszenz. Auf die Bedeutung dieser Erscheinung wird weiter unten eingegangen werden. Die wässerige Suspension hitzedenaturierten Albumins wird durch Natronlaugenzusatz auf n/100 NaOH-Endkonzentration gebracht. Nach zweimal je zehnstündigem Schütteln unter Toluolzusatz wird die Lösung, deren gelbliche Färbung dem Farbstoff des nicht hämoglobinhaltigen Serums entspricht, filtriert. Dieselbe ist vollkommen klar, die Leitfähigkeit, H-Aktivität und der Eiweißgehalt werden bestimmt (Tabelle II).

Tabelle II.

4 g hitzegefälltes Albumin geschüttelt mit	K	C_{OH}	Eiweißgehalt Proz.	Verhalten beim Neutralisieren
Aqua destillata . . .	$1{,}98 \cdot 10^{-5}$	—	Deutliche Opaleszenz auf Erhitzen und Sulfosalizylsäure	—
100 ccm n/100 NaOH	$5{,}25 \cdot 10^{-4}$	$5{,}35 \cdot 10^{-5}$	1,47	stabil
100 ccm 0,85 proz. NaCl	—	—	$> 0{,}01$	—

Um nun festzustellen, ob bei Vermeidung einer etwaigen, im Verlauf der Fällung oder bei Behandlung mit Wasser auftretenden

weitergehenden Dehydration das hitzekoagulierte Albumin in Neutralsalzlösungen löslich sei, wurde versucht, ähnlich wie beim Globulin, diejenige kleinste Salzmenge zu bestimmen, in deren Gegenwart das hitzedenaturierte Albumin beim Neutralisieren seines NaOH-Gehalts nicht ausfällt. Es zeigte sich nun die nach früheren eigenen Erfahrungen überraschende Tatsache, daß diese Salzmenge der bei Neutralisation entstehenden entsprach, da die Lösung beim bloßen Neutralisieren mit Salzsäure unverändert erschien. Dieses bemerkenswerte Verhalten kann eine doppelte Deutung erfahren. Entweder würden 100 ccm 0,005 n NaCl-Lösung 0,73 g hitzedenaturierten Albumins in Lösung halten, das Lösungsvermögen der Neutralsalze für hitzedenaturiertes Albumin dasjenige für Globulin bei weitem übertreffen. Damit wäre auch die Tatsache in Übereinstimmung, daß die neutralen, salzhaltigen, hitzedenaturierten Albuminlösungen bei Verdünnung stabil und klar bleiben. Die in Globulin III[1]) bei Verdünnung der Neutralsalzlösung auftretende H-Ionenvermehrung wird beim hitzedenaturierten Albumin bei ähnlichen Versuchsbedingungen vermißt (Tabelle III).

Tabelle III.

	n/10 KCl hitzegefälltes Albumin	Verdünnt mit Wasser 1:3	n/10 NaCl Globulin	Verdünnt mit Wasser 1:3
p_H	$5{,}24 \cdot 10^{-6}$	$1{,}46 \cdot 10^{-6}$	$5{,}76 \cdot 10^{-6}$	$9{,}39 \cdot 10^{-6}$
Verhalten beim Verdünnen	—	Aufhelluug	—	Beginnende Fällung

Das Verhalten des hitzedenaturierten Albumins scheint darnach recht auffällig im Widerspruch zu den übrigen Erfahrungen bezüglich der Neutralsalzlöslichkeit lyophober Proteine zu stehen, so daß die vorliegenden Befunde dringend einer Ergänzung bedürftig erscheinen. Wie beim Salzglobulin, sollte untersucht werden, wieweit die Übereinstimmung zwischen der durch Neutralisation der alkalischen Lösung im Salzüberschuß hergestellten und der durch direktes Auflösen in Neutralsalzlösung gewonnenen Verbindung reiche. Zu diesem Zwecke wurde das oben beschriebene, hitzedenaturierte Albumin in physiologischer NaCl-Lösung (0,85proz.) suspendiert und geschüttelt. Im Gegensatz zu den entsprechenden Ergebnissen am Salzglobulin zeigte sich, daß die direkte Salzlöslichkeit des hitzedenaturierten Albumins nur ganz geringfügig sei, sie beträgt nicht mehr als 1 Proz. der am Globulin festgestellten Werte. Bevor nun diese Diskrepanz zum Gegenstand einer weiteren Untersuchung gemacht werden konnte, mußte zunächst ausgeschlossen werden, daß

[1]) *M. Adolf*, Kolloidchem. Beih. 18, 276, 1923.

das hitzedenaturierte Albumin durch die Behandlung mit NaO eine tiefere Veränderung erfahre. Diese Deutung erscheint u so naheliegender, als im vorliegenden Falle das in NaOH gelös hitzegefällte Albumin, das besonders von *Michaelis*[1]) zur Charakter sierung desselben herangezogene Moment des Ausfallens bei neutral sierender Lösung vermissen läßt. Um die Eigenschaften des hitz denaturierten Albumins nach Lösung desselben in NaOH beurteile zu können, mußte zunächst die letztere entfernt werden. Zu diese Zwecke wurde die betreffende Lösung hitzeveränderten Albumins i NaOH unter Vermeidung jeglicher Erwärmung der Elektrodialys unterworfen, welche bis zur Erreichung der ursprünglichen Leitfähigkei der Albuminlösung durchgeführt wurde. Während dieser Behandlun zeigte die Flüssigkeit keine wie immer geartete Veränderung, kein Trübung, keine Niederschlagsbildung. Es kam nur während der Elektro dialsye das in Elektrolytgegenwart bekannte Schichtungsphänomen des löslichen Eiweißes zur Beobachtung. Die Flüssigkeit selbst is vollkommen klar, gelblich wie das ursprüngliche Albumin. Auf Halb- sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ zeigt dieselbe keine Trübung. Auch nach einer Beobachtungsdauer von etwa einem halben Jahre bleibt die Reaktionsweise des Eiweißkörpers, der in dieser Arbeit als Protein χ bezeichnet werden soll, gegenüber Am_2SO_4 unverändert. Die Reaktion der Flüssigkeit ist entsprechend derjenigen des ursprüng- lichen Albumins schwach sauer (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV.

	$K_{unkorr.}$	C_H	$[\alpha]_D^{20}$	HKP für 0,4 Proz. der Lösung	Hitzekoagu- lations- temperatur
1 proz. Protein χ . .	$8{,}26 \cdot 10^{-6}$	$5{,}3 \cdot 10^{-6}$	66,5	48°	39°
1 proz. genuines Serumalbumin . .	$7{,}8 \cdot 10^{-6}$	$5{,}7 \cdot 10^{-6}$	66,4	48°	—

Das Ergebnis der Bestimmung der C_H läßt sich leicht mit dem der Leitfähigkeit vereinbaren. Der niedrige Wert der letzteren, welche der Leitfähigkeit des genuinen Albumins entspricht, läßt es ebenso wie die schwach saure Reaktion als wahrscheinlich erscheinen, daß die zur Lösung des hitzegefällten Albumins verwendete Lauge praktisch quantitativ entfernt worden ist. Dementsprechend zeigt auch der fragliche Eiweißkörper vollständige Koagulation beim Erhitzen. Im *Pauli*schen Laboratorium konnte in früheren Untersuchungen[2]) gezeigt

[1]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, l. c.

[2]) *Wo. Pauli*, Pflügers Arch. **78**, 315, 1899; Hofmeisters Beitr. **10**, 53, 1907; *Wo. Pauli* und *H. Handovsky*, diese Zeitschr. **24**, 239, 1910.

werden, daß bei Einhaltung bestimmter Kautelen, vor allem eines gleichmäßigen zeitlichen Wärmezuwachses, entgegen der Auffassung von *Chick* und *Martin* genügend scharfe vergleichende Bestimmungen der Gerinnungstemperatur ausführbar sind. Nachdem nun diese letzteren, unter anderen von *Fernau* und *Pauli*[1]) zum Nachweis der durch Radiumbestrahlung hervorgerufenen Veränderung des Albuminversuchs verwendet worden sind, wurde hier die Bestimmung der Gerinnungstemperatur zur näheren Untersuchung des fraglichen Eiweißkörpers und zum Vergleich desselben mit genuinem Albumin herangezogen. Wie in Tabelle IV verzeichnet, zeigen beide Proteine bei gleicher Konzentration und Versuchsbedingungen die gleiche Gerinnungstemperatur. Ebenso wie beim genuinen Albumin [vgl. *Haycraft* und *Duggan*[2])] entsprechen auch beim fraglichen Eiweißkörper höheren Konzentrationen desselben niedrigere Gerinnungstemperaturen. Die elektrodialysierte Lösung hitzeveränderten Albumins in NaOH zeigt somit alle Eigenschaften eines wasserlöslichen Proteins. Zur größeren Sicherheit wurden die vorliegenden Befunde an drei verschiedenen Präparaten von hitzegefälltem Serumalbumin mit stets gleichem Ergebnis nachgeprüft. Da Kontrollversuche an erhitztem Natriumalbuminat (s. weiter unten) ergaben, daß die Elektrodialyse das Eiweiß restlos fällte, so kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß der Übergang des hitzegefällten Produkts in ein wasserlösliches Protein bei der Elektrodialyse des ersteren infolge NaOH-Gegenwart erfolgt. Desgleichen waren durch Fäulnis bewirkte Veränderungen kaum anzunehmen, da die Flüssigkeit stets reichlich toluolisiert war und ein bakterieller oder fermentativer Abbau wenigstens teilweise zu dialysablen und nicht hitzekoagulierbaren Produkten geführt hätte, deren Vorhandensein aber durch die nachweisbare quantitative Überführung der alkalischen Lösung von hitzedenaturiertem Albumin in wasserlösliches koagulables Eiweiß ausgeschlossen werden kann. So kann nur die Behandlung des hitzedenaturierten Albumins mit Lauge als Ursache für dessen Veränderung angenommen werden. Die scheinbar unbegrenzte Salzlöslichkeit, die bei der Neutralisierung des in Lauge gelösten hitzedenaturierten Albumins beobachtet wurde, erklärt sich dadurch, daß dieses Protein eben bereits wasserlöslich war. Aber auch der eingangs erwähnten, nach mehrstündigem Schütteln mit Wasser beobachteten erhöhten Leitfähigkeit und dem nachweisbaren Eiweißgehalt des letzteren kann eine ähnliche Deutung gegeben werden wie der Laugenwirkung.

---

[1]) *A. Fernau* und *Wo. Pauli*, diese Zeitschr. **70**, 426, 1915.

[2]) *J. B. Haycraft* and *T. R. Duggan*, Journ. of Anat. and Phys. **24**, 288; Brit. Med. Journ. **167**, 1890.

Bevor nun auf diese Frage näher eingegangen werden soll, welchem Sinne die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung näher gedeutet werden können, soll noch über Experimente bericht werden, die der Prüfung des Einflusses dienten, den eine Verschiebu des Verhältnisses zwischen NaOH und hitzedenaturiertem Albumi auf die Eigenschaften des gelösten Produkts ausübt. Frühere Ve suche[1]), welcher in einer Anmerkung im Globulin III gedacht worde sind, führten nämlich zu einem von dem vorliegenden ganz abweichende Resultat, indem das in NaOH gelöste hitzedenaturierte Albumin b Neutralisation in Salzgegenwart ausfiel. Differenzen der Versuch anordnung bestanden insofern, als im letzteren Falle nicht im Eiwei überschuß gearbeitet worden war.

Tabelle V.

Nr.	Eiweiß auf 10^{-3} Äquiv. NaOH g	Trockengehalt der Lösung Proz.	Lösl. Protein nach Elektrodialyse Proz.	Lösl. Protein in Proz. des Trockengehaltes der Ausgangslösung	Neutralsalzlöslichkeit (n/1 KCl) des fällb. Anteiles
1	4,0	1,470	1,47	100	
2	2,0	1,120	0,80	72	+
3	1,0	1,000	0,42	40	+
4	0,5	0,465	*0*	*0*	—
5	1 g Eiweiß auf $1 \cdot 10^{-3}$ HCl	0,640	0,23	37	+
6	Rückstand von Versuch 1 in NaOH gelöst, so daß Albumin- u. Laugenverh. 2 entspricht	0,760	0,54	71	+

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß wechselnde Mengen des gleichen hitzedenaturierten Albumins wie oben in je 100 ccm n/100 NaOH in ganz gleicher Weise zur Auflösung gebracht wurden (vgl. Tabelle V). Da zeigte sich zunächst, daß mit abnehmender Menge des verwendeten Proteins wohl der absolute Eiweißgehalt der entstandenen Lösungen abnahm, wobei jedoch ein immer kleinerer Eiweißrest ungelöst blieb. Elektrodialysierte man nun diese Flüssigkeiten, so nahm die Menge des dabei in Lösung bleibenden Eiweißes mit der Menge des ursprünglich verwendeten hitzedenaturierten Albumins ab und verschwand schließlich völlig, so daß bei der Lösung von ½ g hitzedenaturierten Albumins in 100 ccm n/100 NaOH eine Eiweißlösung entsteht, die durch Elektrodialyse quantitativ niedergeschlagen wird. Es existieren somit zwei Grenzfälle, innerhalb deren es stetige Übergänge gibt. Bei genügendem Eiweißüberschuß entsteht nur wasserlösliches Protein, bei entsprechendem

[1]) Vgl. *M. Adolf*, Kolloidchem. Beih. 18, 276, 1923.

Laugenüberschuß nur wasserunlösliches. Im ersteren Falle war noch festzustellen, ob das ungelöst übrig gebliebene hitzedenaturierte Albumin eine Veränderung erlitten habe oder ob die verwendete Lauge nur zur Lösung eines Teiles hinreichte. Stellte man nun durch Laugenzusatz zu dem ungelöst gebliebenen, von dem löslichen möglichst getrennten Anteil das gleiche Verhältnis zwischen hitzedenaturiertem Albumin und Lauge her, wie in Versuch 2, so zeigte sich, daß in der nun entstandenen Lösung die Relation des wasserlöslichen zu dem Gesamteiweißgehalt wiederum innerhalb der Versuchsfehlergrenzen befriedigend übereinstimmte. Dieses Ergebnis dürfte in dem Sinne zu verwerten sein, daß der ungelöste Bodenkörper in Versuch 1 durch den ersten Laugenzusatz keine merkbare Veränderung erfahren hat.

Nur ein einzelner Versuch wurde gemacht, um die Löslichkeit des hitzedenaturierten Albumins in Säuren festzustellen und die Natur der entstehenden Lösung zu bestimmen. Dieser Versuch zeigt, daß Säure sich anscheinend nur quantitativ verschieden von Lauge im Sinne einer geringeren Lösungsfähigkeit verhält, hingegen die Zusammensetzung einer solchen Lösung aus löslichem und unlöslichem Protein derjenigen der entsprechenden alkalischen recht nahe kommt. (Versuche, die NaOH durch NH_3 zu ersetzen, führen wohl zu qualitativ übereinstimmenden Resultaten mit den obigen, insofern die bei Eiweißüberschuß in Lösung gegangene Proteinmenge sich nach der Elektrodialyse als wasserlöslich erwies. Wegen des geringeren „Lösungsvermögens" des NH_3 wurden jedoch diese Versuche zunächst nicht fortgesetzt.)

Schließlich zeigte sich (vgl. Tabelle V), daß die Salzlöslichkeit des durch Elektrolyse fällbaren Proteinanteils eine Änderung mit der Verschiebung des hitzedenaturierten Verhältnisses zwischen hitzeverändertem Albumin und Lauge aufweist, so daß dieselbe mit der Abnahme des letzteren sich vermindert. Wird das gesamte Protein durch Elektrodialyse gefällt, so ist auch dessen Salzlöslichkeit verschwunden.

Versuchen wir die hier gegebenen Versuchsresultate näher zu beurteilen, so entsteht zunächst die Frage nach der Natur des löslichen Proteins, ob dasselbe als ein durch Laugenbehandlung rückverwandeltes Denaturierungsprodukt mit dem genuinen Albumin als identisch aufzufassen oder ob es von dem letzteren verschieden ist. In diesem Falle würde es sich dann um einen bislang unbekannten wasserlöslichen Eiweißkörper handeln.

Nach physikalisch-chemischen Kriterien läßt sich, wie bereits angegeben worden ist, das fragliche Produkt nicht vom genuinen Albumin unterscheiden. *Michaelis* und *Rona* stehen z. B. nicht an, ein bei der Lösung von rasch koaguliertem Albumin in HCl entstehendes, bei Neutralisation erneut hitzekoagulables Protein als

durch reversible Veränderung wieder hergestelltes Albumin zu deute
Als nächste Möglichkeit wäre wohl an durch Hydrolyse des Hitz
denaturierungsprodukts durch NaOH oder HCl gebildete löslic
Albumosen zu denken. Allein primäre Albumosen werden nach *E.*
Pick[1]) durch Halbsättigung mittels Ammonsulfat vollständig gefäl
während allen Abbaustoffen des Eiweißes das fehlende Koagulation
vermögen beim Erhitztwerden gemeinsam ist. Versuche, Differenz
zwischen genuinem und denaturiertem Albumin auf chemisch-analyt
schem Wege festzustellen, scheinen nach dem negativen Ausfall d
Sulfid-Schwefelnachweises, der geringfügigen Leitfähigkeitssteigeru
bei der Koagulation und nach den letzten, eingangs bereits erwähnte
Arbeiten von *Sörensen*, welcher nach seinen Befunden annimmt, da
beim Eialbumin die Hitzekoagulation ebenso wie die Alkoholfällun
ohne Stickstoffabgabe abläuft, nicht sehr aussichtsreich zu sein.

Anhaltspunkte für die Feststellung etwaiger stattgefundener Ve
änderungen lassen sich hingegen von der Untersuchung des optische
Drehungsvermögens der fraglichen Eiweißlösung erwarten.

So konnte z. B. *Alexander*[2]) zeigen, daß das Drehungsvermögen eine
gelösten Proteins eine erhebliche Beeinflussung erfährt, wenn man di
Lösung vor dem Messen während einer bestimmten Zeit bei einer hohe
Temperatur erhält. *Hoppe-Seyler*[3]) gibt an, daß Alkalialbuminate di
Ebene des polarisierten Lichtes stärker nach links drehen als die Eiweiß
stoffe, aus denen sie entstanden sind. Danach zeigt Serumalbumin be
Behandlung mit starker KOH eine Steigerung von $[\alpha]_D$ — 60,01 auf — 86°

Schließlich konnten *Pauli* und *Samec*[4]) den Nachweis erbringen, daß
bei Säure- und Laugenzusatz zu Albumin durch einfache Proteinsalz
bildung bei Zimmertemperatur eine Steigerung der optischen Drehung auf
tritt, die nach Entfernung der genannten Zusätze wieder verschwindet

Die Bestimmung der optischen Drehung geschah mit Hilfe eine
Apparates von *Schmidt-Hänsch*.

Das in Tabelle IV gebrachte Ergebnis zeigt nach Reduktion au
den gleichen Eiweißgehalt eine recht befriedigende Übereinstimmung
mit den seinerzeit von *Pauli*, *Frisch* und *Valkó*[5]) angegebenen Daten
für ein nach dem gleichen Verfahren dargestelltes globulinfreies Albumin
Somit scheint aus diesen Beobachtungen hervorzugehen, daß jene
Gruppen im Eiweißmolekül, deren Modifikation in einer Änderung
der optischen Drehung zum Ausdruck kommen würde, trotz der bei
Gewinnung des Eiweißkörpers erfolgten Eingriffe unversehrt geblieben

[1]) *E. P. Pick*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24.

[2]) *A. C. Alexander*, Journ. of exper. Med. 1, 304, 1896.

[3]) *Hoppe-Seyler-Tierfelder*. Handb. d. phys. u. path.-chem. Analyse, 8. Aufl., 1909.

[4]) *Wo. Pauli, M. Samec* und *E. Strauss*, diese Zeitschr. 59, 470, 1914.

[5]) *J. Frisch, Wo. Pauli* und *E. Valkó*, diese Zeitschr. 164, 401, 1925.

sind. Die Unterschiede unseres Proteins gegenüber einem typischen Alkalialbuminat liegen klar zutage.

Ferner erschien es nach den Untersuchungen von *Zsigmondy*[1]) aussichtsvoll, die von diesem Verfasser zum ersten Male systematisch verwendeten Beziehungen von Kolloiden zu hochmolekularen Stoffen zu einer Charakterisierung der letzteren auch im vorliegenden Falle zu verwenden. Jedoch wurden, im Gegensatz zu *Zsigmondy*, nicht die Schutzzahlen der zu untersuchenden Verbindungen, sondern entsprechend Untersuchungen von *Pauli* und *Flecker*[2]) die dialysiertes Formolgoldsol fällenden Mengen der zu charakterisierenden Proteine bestimmt.

Gegenüber dem Goldsol zeigt der fragliche Eiweißkörper qualitativ das gleiche Verhalten wie genuines Albumin, das jedoch nach *Zunz* auch bei einigen primären Albumosen beobachtet wird. Diese Übereinstimmung erstreckt sich auch auf die Kombination mit Salzen. Quantitativ jedoch erweist sich der fragliche Eiweißkörper in seinem Goldsolverhalten von genuinem Albumin insofern verschieden, als größere Mengen desselben zur Erzielung des Goldumschlags notwendig sind (vgl. Tabelle VI und VII).

Tabelle VI.

GS dialys., $K = 6{,}67 \cdot 10^{-6}$, neutr.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Protein X, mg im ccm	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Nach 6 Stunden	θ	R_v	$R_v V$	V	ausgefl.
„ 24 „			unverändert		

Tabelle VII.

GS wie oben	0,5	0,5	0,5	0,5
[illegible] Albumin, mg pro ccm	1,0	2,0	3,0	4,0
[illegible]	θ	V	V	V
[illegible] 24 Stunden	θ	ausgefl.	ausgefl.	ausgefl.

Gegen die Möglichkeit, daß diese Verschiedenheiten auf chemischen Differenzen der hier verglichenen Proteine beruhen können, dürften die Ergebnisse der übrigen Untersuchungen sprechen. Hingegen existieren Angaben in der Literatur, aus welchen hervorgeht, daß physikalisch-chemische Veränderungen eines Proteins hinreichen, um dessen Verhalten als Schutzkolloid quantitativ zu modifizieren.

---

[1]) *R. Zsigmondy*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **40**, 697, 1901.
[2]) *Wo. Pauli* und *L. Flecker*, diese Zeitschr. 41, 461, 1912.

So beobachten *Heubner* und *Jakobs*[1]) irreversible Änderungen (Goldzahl von in getrocknetem Zustande gealtertem Albumin. *Fodo* weist darauf hin, daß schon die üblichen Herstellungsverfahren des Albumi wie Neutralsalzfällung und Elektrodialyse, dessen Solvatation und (davon abhängigen Phänomene, so die Schutzwirkung, verändern. Endl geht aus den Versuchen von *Menz*[3]), die von *Elliott* und *Sheppard*[4]) sov von Verfasserin[5]) bestätigt werden konnten, hervor, daß zeitlich reversil Zustandsänderungen der Gelatine hinreichen, um das Fällungsvermög derselben für Goldsol zu verändern.

Somit werden Verschiedenheiten des Dispersitätsgrades und d Hydration als hinreichende Ursachen der Änderung der Schutzwirku von Proteinen aufgefaßt.

In diesem Zusammenhang mögen Versuche von Interesse sei deren Gegenstand die Alkoholfällbarkeit des zu untersuchenden Eiwei körpers bildet.

Schorr[6]), der eine Darstellung der verschiedenen Deutungen d Mechanismus der Alkoholeiweißfällung versuchte, folgert, daß aus de Gesetz der Massenwirkung die Fällungswirkung einer bestimmten Alkoho konzentration um so geringer sein muß, je größer die an das Eiweiß a Sol gebundene Wassermenge und je inniger diese Bindung ist.

Vergleichende Untersuchungen des fraglichen Eiweißkörpers un des genuinen Albumins bezüglich ihrer Fällbarkeit durch Alkoho haben eine vollständige quantitative Übereinstimmung dargetan welche sich auch auf das Verhalten in gepufferten Lösungen und au die (vgl. Tabelle VIII bis X) durch Neutralsalzzusatz bewirkte Fällungs hemmung erstreckt. Jedoch ist die durch die gleiche Menge Alkoho in der Lösung des Proteins X hervorgerufene Trübung bedeutend inten siver als in der des genuinen Albumins, so daß auch in diesem Fall ein, wenn auch nur geringfügiger Unterschied im Verhalten der beide Proteine nachgewiesen werden konnte.

Tabelle VIII.

0,4 proz. genuines Seralbumin bzw. 0,4 proz. Protein X, ccm	1	1	1	1	1	1
95 proz. Alkohol	0,1 n	0,11 n	0,12 n	0,13 n	0,14 n	0,15 n
Sofort	+	++	++	+++	+++	+++

[1]) *W. Heubner* und *Fr. Jakobs*, diese Zeitschr. **58**, 352, 1913.
[2]) *A. Fodor*, Die Grundlagen der Dispersoidchemie. Steinkopff, 1925.
[3]) *W. Menz*, Zeitschr. f. physik. Chem. **66**, 129, 1909.
[4]) *Elliott* und *Sheppard*, Journ. Ind. Eng. Chem. **13**, 699, 1921.
[5]) Noch unveröffentlicht.
[6]) *C. Schorr*, diese Zeitschr. **37**, 424, 1911.

Tabelle IX.
Bei Zusatz von je 15 Tropfen Alkohol.

säure / Acetat	8	4	2	1,5	1	0,75	0,5
Genuines Albumin	θ	θ	+	+	××	×	×
Protein X	θ	θ	++	++	×××	×	×

Tabelle X.

proz. genuines Seralbumin bzw. 0,4proz. Protein X, ccm	1	1	1	1
Endkonzentration	0,0	0,001	0,01	0,1
proz. Alkohol, ccm	0,15	0,15	0,15	0,15
Reaktion des genuinen / „ „ Proteins χ*)	+++	++	θ	θ

*) Die Reaktionen des Proteins χ sind intensiver als die des genuinen.

Eine analoge Deutung wie den Versuchen am Goldsol dürfte auch dem Verhalten des Proteins χ im Vergleich zum genuinen Albumin gegenüber Mastixsol zukommen, obwohl nach den Untersuchungen von *Zunz*[1]) die am Goldsol gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf das Mastixsol übertragbar sind. Aus den Resultaten von Tabelle XI bis XIV ist zu entnehmen, daß ebenso wie das genuine Albumin das Protein χ imstande ist, Mastixsol zur Ausflockung zu bringen, wobei ebenso wie beim genuinen die Unterschiede in den Reaktionen mit frischen und alten Mastixsolen in Erscheinung treten, daß aber hierzu größere Mengen des Proteins χ notwendig sind.

Tabelle XI.

Frisch. Mastixsol, ccm	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Protein X, mg/ccm	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Sofort und nach 6 Stunden	θ	θ	θ	θ	θ	θ	×	××	××	×××

Tabelle XII.

Frisches Mastixsol, ccm	1	1	1	1
Genuines Seralbumin, mg/ccm	0,42	0,7	0,98	1,26
Nach 1 Stunde	θ	θ	θ	×××
„ 24 Stunden	θ	θ	θ	×××

Tabelle XIII.

Altes Mastixsol, ccm	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Protein X, mg/ccm	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Sofort und nach 6 Stunden	θ	θ	××	×××	×××	×××	×××	×××	×××	×××

[1]) *E. Zunz*, Arch. internat. de Physiol. 5, III, 425, 1907.

Tabelle XIV.

Altes Mastixsol, ccm	1	1	1	1	1
Genuines Seralbumin, mg/ccm	0,14	0,42	0,7	0,98	1,26
Nach 1 Stunde	××	×××	×××	×××	××
„ 24 Stunden	×××	×××	×××	×××	××

Aus dem hier Vorgebrachten geht demnach hervor, c quantitative Unterschiede zwischen dem Protein χ und genuin Albumin bezüglich ihres Fällungsvermögens für Gold- und Mastix und ihrer Alkoholreaktion existieren. Diese Differenzen lassen s als der Ausdruck verschiedener Hydratation deuten, ohne daß ei Erklärung dieser Erscheinung etwa durch die Annahme verschiedei Dispersitätsgrade versucht würde.

Um aber im vorliegenden Falle ein weiteres Kriterium zu v suchen, wurden zur Charakterisierung des Proteins X die weit em findlicheren immunbiologischen Untersuchungsmethoden herangezoge Zum Zwecke der Identifizierung von Eiweißkörpern lagen in d Literatur der Serologie im wesentlichen Angaben über Verwendu der Präzipitinmethode[1]), des Anaphylaxieversuchs[2]) und der Ko plementbindung[3]) vor. Aus weiter unten näher ausgeführten Gründ wurde im vorliegenden Falle die Präzipitinmethode herangezogen.

Nachdem *R. Kraus*[4]) nach Einverleibung von Bakterien das Au treten von Stoffen in den Seren der betreffenden Tiere beobachten konnt welche mit keimfreien Kulturfiltraten der homologen Mikroorganism spezifische Fällungen gaben, wurden von *Bordet*[5]) und *Tstistowitsch* diesen sogenannten Bakterienpräzipitinen, die auf Einverleibung von Eiwei körpern entstehenden Abwehrkörper als Eiweißpräzipitine entgegengestell Es konnte nun gezeigt werden, daß diese Eiweißpräzipitine weitgehen spezifisch sind, d. h. nur mit dem zur Vorbehandlung verwendeten Protei reagieren. Während nun die Artspezifität der Proteine in großzügig Weise für forensische Zwecke ausgebaut worden ist, konnten *Obermayer* un *Pick* den Nachweis erbringen, daß auch chemische und physikochemische Ei griffe am Eiweißmolekül imstande sind, dessen sichtbare Reaktion m nativem Immunserum zu verhindern und andererseits den antigene

[1]) *F. Obermeyer* und *E. P. Pick*, Wien. klin. Rundsch. 1902, Nr. 15 Wien. klin. Wochenschr. 1903, S. 659; 1906, Nr. 12; *W. A. Schmidt*, dies Zeitschr. 14, 294, 1908 (Literatur).

[2]) *E. P. Pick* und *Yamanouchi*, Wien. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 44 Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1, 676, 1909; *R. Doerr* und *Russ*, ebendaselbs 8, H. 7, 1909; *Wells*, Journ. of infect. diseases 5, Nr. 4, 1908; *Besredka* Ann. de l'Institut Pasteur 21, 950, 1907.

[3]) *Wells* und *Lewis*, Proc. of the Amer. Soc. of Biol. Chemists 18th meeting, 27, ir., 2, 3, Dezember 1923.

[4]) *R. Kraus*, Wien. klin. Wochenschr. 1897, Nr. 32.

[5]) *Bordet*, Ann. Pasteur 1899, S. 173.

[6]) *Tstistowitsch*, ebendaselbst 1899, S. 406.

Charakter des betreffenden Eiweißkörpers so weit zu verändern, daß das durch dasselbe hergestellte Immunserum ausschließlich oder vorwiegend mit dem veränderten Protein reagiert.

Bezüglich einiger älterer Angaben der Literatur, betreffend das Unvermögen von erhitztem Eiweiß, mit nativem Immunserum Präzipitation zu geben, sei auf eine Zusammenstellung von *Nuttall*[1]) und Versuche von *Graham-Smith*[2]) verwiesen. *Obermayer* und *Pick* geben nun an, daß das Präzipitin vollständig versage, wenn es mit einem gekochten, aber nicht koagulierten Serum zusammengebracht wird. Diese Beobachtungen konnten weiterhin unter anderem von *Schmidt*, *Landsteiner* und *Prašek*[3]) bestätigt werden.

Entsprechend diesen Ergebnissen wurde nun versucht, das Verhalten des wasserlöslichen, aus Pferdeserumalbumin stammenden, der Temperatur von 100° C durch 15 Minuten hindurch ausgesetzt gewesenen Protein X gegenüber einem nativen Pferdeserumpräzipitin (Serotherapeutisches Institut, Wien) festzustellen.

Bevor mit der Beschreibung der Versuche begonnen werden kann, soll noch auf einige durch die besondere Art des vorliegenden Materials bedingte Komplikationen hingewiesen werden.

Das zur Verfügung stehende präzipitierende Serum war durch Vorbehandlung mit Serum und nicht mit Albumin allein hergestellt worden. Nach der von *E. P. Pick*[4]) herrührenden Angabe, daß ein Normalpräzipitinimmunserum mit der Pseudoglobulinfraktion den stärksten Niederschlag, mit der Euglobulinfraktion einen geringeren und mit der Albuminfraktion entweder kein oder nur ein spärliches Präzipitat liefert, schienen die hier in Betracht kommenden Versuche im vorhinein nicht sehr aussichtsreich zu sein. Außerdem gaben *Michaelis* und *Oppenheimer*[5]) an, durch Vorbehandlung mit Vollserum ein Antiserum gewonnen zu haben, welches mit Vollserum und Globulin, nicht aber mit Albumin reagiert[6]). Demgegenüber sei nur eine gegenteilige, der neuesten Literatur entstammende Angabe von *Hektoen* und *Welker*[7]) erwähnt, wonach bei Injektion von Vollserum bei Tieren die Bildung von Antikörpern gegen die einzelnen Serumproteine ausgelöst würde.

Ferner muß hier hervorgehoben werden, daß das Albumin einer langdauernden Elektrodialyse mit wiederholten Salzzusätzen zwecks vollständiger Globulinbefreiung unterzogen worden war. Nun wurde bis jetzt noch nicht der Nachweis erbracht, daß diese Behandlung das Albumin vollständig unverändert lasse. Eine diesbezügliche Angabe erschien um so notwendiger, als *Handovsky*[8]) über die erhöhte Empfindlichkeit von

[1]) *Nutall*, Blood Immunity and Relationship. Cambridge 1904.

[2]) *Graham-Smith*, Journ. of Hygiene 3, 356, 1903.

[3]) *K. Landsteiner* und *E. Prašek*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 20, 211, 1913.

[4]) *E. P. Pick*, Handb. v. Kolle-Wassermann 1, 703, 1912.

[5]) *L. Michaelis* und *Oppenheimer*, Arch. f. Anat. u. Phys. 1902, Supplementband; Deutsch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 32.

[6]) Vgl. *P. Uhlenhuth* und *K. Steffenhagen*, Handb. v. Kolle-Wassermann, 2. Aufl., 3, 270 (Literatur).

[7]) *L. Hektoen* und *W. Welker*, Journ. of infect. dis. 35, 295, 1924.

[8]) *H. Handovsky*, diese Zeitschr. 25, 510, 1910.

salzfreien, allerdings globulinhaltigen Albuminlösungen gegenüber denat
rierenden Temperatureinflüssen berichtet hat und *Lepeschkin*, wie bere
erwähnt wurde, schon die lange Dauer der bloßen Dialyse in den *Pauli*sch
Versuchen als Ursache angeblicher Modifikationen des so erzielten Albumi
betrachtet. Es mußten daher zuerst Präzipitationsversuche mit dem v
liegenden Albumin, bevor es der Hitzeveränderung unterzogen worden w
angestellt werden. Der Titer des verwendeten Pferdeserumpräzipitins f
das genuine Albumin wurde in der von *Uhlenhuth*[1]) angegebenen Wei
bestimmt, indem diejenige stärkste Albuminverdünnung mit 0,85pr
NaCl festgestellt wurde, die mit dem unverdünnten Präzipitinserum no
eine sichtbare Trübung an der Berührungsfläche gibt. Zur Kontro
wurden Proben von elektrodialysiertem Hundeserumalbumin und Na
mit Präzipitinserum versetzt.

Bei der Beurteilung der im folgenden zu besprechenden serologisch
Probleme stand mir Herr Professor *E. P. Pick* mit seinem wertvoll
Rate zur Seite. Hierfür und für die freundliche Erlaubnis, die z
Analyse dieser Fragen nötigen Tierversuche in dem von ihm geleitete
Pharmakologischen Institute der Wiener Universität auszuführen, s
mir gestattet, Herrn Professor *Pick* auch an dieser Stelle meinen e
gebensten Dank auszusprechen.

Tabelle XV.

0,1 ccm Präzipitin auf 1 ccm Albumin-NaCl-Mischung.

Verdünnungen mit 0,85 proz. NaCl	1 proz. Pferdeserumalbumin	Präparat I (vgl. Tab. IV) nach Elektrodialyse	Hundeserumalbumin	NaCl	Präparat IV nach Elektrodialyse	Albumin + NaOH, End-konzentr. 0,005 n	Albumin + NaOH, End-konzentr. 0,005 n, gekocht	Pferde- Kokto- serum
1 : 100	+++	+++	θ	θ	+	+++	θ	—
1 : 1000	+++	+++	θ		+	+++	θ	—
1 : 10 000	++	++			+	++	θ	—
1 : 100 000	+	+			θ	+		—
1 : 1 000 000	θ	θ				θ		—

Die in Tabelle XV wiedergegebenen Versuchsresultate zeigen, daß
das elektrodialysierte Pferdeserumalbumin noch bei weitgehende
(1 : 100000) Verdünnung durch präzipitierendes Pferdeserum gefällt
wird. Der negative Ausfall der Kontrollproben zeigt die Spezifizität
der Reaktion an. Somit erscheinen die Angaben von *Hektoen* und
Welker bestätigt, wonach das Vollserumpräzipitin auch Antikörper
gegen die Albuminfraktion des Serums enthält. (Versuchsergebnisse
über das Verhalten der anderen elektrodialytisch dargestellten Serum-
proteine werden an anderer Stelle gebracht werden.) Andererseits geht
aus dem hier Gegebenen hervor, daß die zur Salz- und Globulin-

[1]) *P. Uhlenhuth* und *O. Weidanz*, Handb. v. Kraus-Levaditi **2**, 790, 1909.

befreiung des Albumins verwendete Elektrodialyse keine Veränderung im Albumin hervorbringt, die zum Verlust von dessen Spezifizität führen würde. Genau dieselbe Anordnung wie für die vorstehenden Versuche wurde nun bei der Untersuchung des nach Hitzefällung in NaOH gelösten und elektrodialysierten wasserlöslichen Proteins befolgt. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, zeigte das Protein X im Präzipitationsversuch vollkommen das gleiche Verhalten wie das genuine Albumin. Es konnte somit das von den eingangs erwähnten Autoren beschriebene charakteristische Nichtreagieren des Koktoserums, das eigene Versuche (vgl. Tabelle XV) bestätigen konnten, gegenüber dem Normalserumpräzipitin an dem hier untersuchten Eiweißkörper nicht nachgewiesen werden, obwohl derselbe 15 Minuten hindurch auf 100° gehalten worden war.

Bevor auf die sich aus diesen Tatsachen ergebenden Schlußfolgerungen näher eingegangen werden soll, mögen hier noch einige Ergebnisse einschlägiger Versuche gebracht werden. So wurde versucht, Präzipitationsversuche mit gekochtem Albumin auszuführen, um statt der am Serum gewonnenen Angaben der Literatur eigene Versuchsresultate zu erlangen. Die Grundbedingung für eine erfolgreiche Durchführung dieser Absicht bestand aber in der Herstellung von klaren Lösungen hitzeveränderten Albumins. Während jedoch Serum durch einfache Verdünnung vor dem Koagulieren beim Erhitzen bewahrt werden kann, waren nach dem oben über die Hitzefällung des Albumins Gesagten zur Erreichung des gleichen Zweckes Verwendung von Zusätzen erforderlich. Von diesen kommen Säure, Laugen und eventuell einige Neutralsalze [Jodide und Rhodanide[1])] in Betracht. In den vorliegenden Versuchen werden nur die ersteren Verbindungen herangezogen. Trotzdem nun in der Literatur zahlreiche Angaben über die Löslichkeit von hitzegefälltem Albumin in Säuren und Laugen existieren, haben die Versuche aus Tabelle V und die eben mitgeteilten Präzipitationsdaten gezeigt, daß die Lösung von hitzegefälltem Albumin in NaOH zu einer weitergehenden Änderung des koagulierten Eiweißkörpers führt. Falls nun bei vermehrtem Laugengehalt wieder ein bei Elektrodialyse ausfällbares Eiweiß auftritt, so erscheint es gar nicht wahrscheinlich, daß dieses letztere mit dem ursprünglichen Koagulat identisch sei. Aber auch die Lösungen des koagulierten Albumins in HCl waren nach dem Obigen nicht brauchbar, vielmehr ergaben Präzipitationsversuche, daß der nach Elektrodialyse wasserlöslich gebliebene Anteil mit Pferdeserumpräzipitin ebenso reagiert wie genuines Albumin. Es blieb also nur die Möglichkeit offen, das Albumin in Gegenwart eines die Fällung verhindernden Säure- oder Laugenzusatzes

---

[1]) *Wo. Pauli* und *H. Handovsky*, Beitr. z. chem. Physiol. 11, 415. 1908.

zu erhitzen. Trotzdem in weiter unten mitzuteilenden Versuch gezeigt worden ist, daß in beiden Fällen ein Produkt entsteht, welch von dem durch bloße Hitzefällung entstandenen verschieden ist, wurde doch ein Präzipitationsversuch mit in Laugengegenwart e hitztem Albumin gemacht. Derselbe war negativ, wiewohl im Kontro versuch gezeigt werden konnte, daß der verwendete Laugenzusa allein nicht imstande ist, die Präzipitation vom genuinen Album zu verhindern.

Pick hat die Hitzeeinwirkung auf Eiweiß dahin gedeutet, daß si dabei „größere Kolloidkomplexe bilden, welche unter Umständen z sichtbaren Koagulation führen können", und hat gezeigt, „daß bei Hitz einwirkung derartig reagierende Antigene ihre ursprüngliche antige Fähigkeit nach dem Erhitzen ändern. Sie erlangen nämlich die Fähigkei Immunkörper zu erzeugen, welche auf die durch das Erhitzen herbe geführte Zustandsphase der Antigene abgestimmt sind." *Obermayer* un *Pick* haben mit Hilfe der Präzipitinreaktion nachgewiesen, daß, falls a Antigen ein erhitztes, vor Koagulation durch Verdünnen mit Wasser ge schütztes Serum verwendet wird, ein Immunserum gewonnen wird, da nunmehr im Gegensatz zu einem mit nativem Eiweiß erhaltenen auch mi erhitztem Serumeiweiß die Präzipitationsreaktion gibt.

Entsprechend diesen Feststellungen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Erstens wurde das Protein X, das sich als präzipitable Substanz wie genuines Albumin verhält, auf seine antigenen Fähigkeiten geprüft, um festzustellen, ob demselben noch in dieser Beziehung die Eigenschaften eines hitzeveränderten Proteins zukommen.

Nach den Angaben von *P. Uhlenhuth* und *O. Weidanz* zur Erzeugung präzipitierender Sera wurden zwei Kaninchen dreimal 3 ccm einer 1proz Lösung des Proteins X in sechstägigen Abständen injiziert. 6 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die erste Blutentnahme.

Das auf diese Weise gewonnene Immunserum beider Tiere präzipitierte den als Antigen verwendeten Eiweißkörper noch in Verdünnungen 1 : 50000 des letzteren, erwies sich damit als brauchbar Den gleichen Titer zeigte das Immunserum gegenüber genuinem Albumin und Normalpferdeserum. Hingegen versagte es in seiner Wirkung vollständig gegenüber Koktoserum, i. e. nach *Obermayer* und *Pick* verdünntes und gekochtes Pferdeserum, und bezüglich genuinem Albumin, welches in Gegenwart von Normosal (Sächs. Serumwerke) mit geringem Sodazusatz, ohne zu koagulieren, erhitzt werden konnte (vgl. Tabelle XVI). Somit ist aus den mitgeteilten Versuchsresultaten zu entnehmen, daß auch bezüglich seiner antigenen Eigenschaften das zu untersuchende lösliche Protein das *charakteristische Verhalten hitzeveränderten Albumins vermissen läßt und auch in dieser Beziehung eine vollständige Übereinstimmung mit dem genuinen Albumin aufweist.*

Tabelle XVI.

0,1 ccm Immunpräzipitin auf 1 ccm Eiweiß-NaCl-Lösung.

Verdünnungen m. 0,85 proz. NaCl	Protein X	Genuines Albumin	Normalserum	Koktoserum	Genuines Albumin m. Normosal u. Na_2CO_3 gekocht	Genuines Albumin + Koktoserum	Genuines Albumin + Protein X	Koktoserum + Protein X
1 : 100	++	++	+++	θ	θ	+	++	+
1 : 1000	++	++	+++	θ	θ	θ	++	θ
1 : 10 000	+	+	+++	θ	θ	θ	+	θ
1 : 50 000	+	+	++	θ	θ	θ	+	θ
1 : 100 000	θ	θ	+	θ	θ	θ	θ	θ

Gegenüber dem immerhin möglichen Einwand, die geschilderten antigenen Eigenschaften des Proteins X könnten auf Beimengungen von genuinem Albumin beruhen, welches der Hitzedenaturierung entgangen sei, möge hier auf das eingangs geschilderte Versuchsverfahren hingewiesen werden, durch welches besonders das Entstehen größerer Koagula vermieden und damit die Gefahr von unveränderten Einschlüssen herabgesetzt wurde, und das zu einer gemäß den Ergebnissen des chemischen Nachweises vollständigen Koagulation des Proteins geführt hat. Jedenfalls waren die in der Hitzedenaturierung etwa entgangenen Eiweißmengen so gering, daß die in relativ kurzer Zeit mit normalen Flüssigkeiten erzielte antigene Wirkung des Proteins X kaum darauf zu beziehen sein dürfte.

Die Übereinstimmung der vorliegenden Resultate mit denjenigen von *Obermayer* und *Pick* konnte noch weiter verfolgt werden. So haben diese Autoren gezeigt, daß das Koktoserum, welchem also die Eigenschaft abgeht, mit präzipitierendem Serum eine Reaktion zu geben, genuinem Serum beigemengt, auch dieses am Präzipitiertwerden durch Normalpräzipitin verhindert. Dementsprechend wurden Versuche mit Gemengen von Koktoserum + genuinem Albumin, Koktoserum + Protein X und genuinem Albumin + Protein X angestellt. In den in Tabelle XVI wiedergegebenen Versuchsresultaten konnte festgestellt werden, daß das Koktoserum das von *Obermayer* und *Pick* gekennzeichnete Verhalten aufweist, das Protein X sich aber auch in dieser Beziehung nicht vom genuinen Albumin unterscheidet.

Zweitens wurde versucht, durch Vorbehandeln von Kaninchen mit hitzeverändertem Albumin (mit gekochtem Serum) ein präzipitierendes Serum zu gewinnen, das auf diese Modifikation des Eiweißes spezifisch eingestellt ist, um das Verhalten desselben zu dem Protein X festzustellen. Gemäß der bereits erwähnten Schwierigkeiten, einerseits hitzeverändertes Albumin ohne sekundäre Veränderungen in lösliche Form zu bringen, andererseits die erfolgte Bildung von

Alkali- oder Acidalbumin bei Lauge- oder Säurezusatz auszuschließe wurde zur Vorbehandlung das bereits erwähnte Koktoserum verwende Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, daß die in Gegenwart d Serumbestandteile erfolgende Hitzeveränderung des Albumins v der im elektrolyt- und globulinfreien Medium stattfindenden ve schieden ist.

Zwei Kaninchen erhielten in Abständen von je 6 Tagen je 3 cc Koktoserum. 6 Tage nach der letzten Injektion ergibt die Bluten nahme ein Serum, dessen Titer gegenüber dem Antigen 1 : 100(beträgt (vgl. Tabelle XVII). Da nach *Obermayer* und *Pick* diese pr zipitierenden Sera nach längerer Behandlungsdauer stets auch m genuinem Serum reagieren, so wurden keine weiteren Versuche zu Erlangung eines höheren Titers angestellt. Bei Prüfung des Verhalten des Koktoimmunserums gegenüber genuinem und Protein X zeigt sic nun (vgl. Tabelle XVII), daß beide Proteine in gleicher Weise kein Präzipitinreaktion mit demselben geben. Somit weist das Protein] auch in seinen Beziehungen zum Koktoimmunserum übereinstimmende Verhalten mit dem genuinen und differentes vom Koktoserum auf.

Tabelle XVII.

0,1 ccm Koktoimmunserum auf 1 ccm Eiweiß-NaCl-Mischung.

Verdünnungen mit 0,85 proz. NaCl	Protein X	Koktoserum	Genuines Albumin
1 · 100	θ	×××	θ
1 . 1000	θ	××	θ
1 . 10 000	θ	××	θ
1 . 50 000	θ	θ	θ

Es scheint demnach nicht möglich, mit Hilfe der hier angewendeten physikalisch-chemischen und immunbiologischen Methodik wesentliche Unterschiede zwischen dem Protein X und seinem Ausgangsmaterial, dem genuinen Serumalbumin, aufzudecken. Die Übereinstimmung ist vielmehr eine so weitgehende, daß, so lange keine neuen dagegen sprechenden Versuchsresultate vorliegen, an eine bestehende Gleichheit der beiden Proteine gedacht werden muß. Eine solche Gleichsetzung würde aber besagen, daß durch die vorgenommene Behandlung des hitzekoagulierten Albumins der Prozeß der Hitzeveränderung auf chemischem Wege reversibel gemacht worden ist, und zwar handelt es sich, da die Rückbildung auf einem anderen Wege zum Ausgangspunkt zurückgeführt hat, nach *Pauli*[1]) um einen Fall von heterodromer Reversibilität.

[1]) *Wo. Pauli*, Kolloidchemie der Eiweißkörper. Dresden, Steinkopff, 1920.

Die Hitzedenaturierung der Eiweißkörper gilt nach der allgemeinen Ansicht für irreversibel (vgl. *Pauli*), aber auch eine durch die Einwirkung chemischer Agenzien bewirkte, allgemein ausführbare Rückverwandlung ist nicht bekannt.

So gibt *Cohnheim* an, daß koaguliertes Eiweiß nicht ohne weitergehende Spaltung und nicht ohne Änderung seiner ursprünglichen Eigenschaften gelöst werden kann, sondern dauernd denaturiert bleibt. Die wenigen gegenteiligen Angaben, wie die von *Corin* und *Ansiaux*[1]), die überdies von *Pauli*[2]) widerlegt worden sind, und diejenigen von *Michaelis* und *Rona*[2]) beziehen sich meist auf das Anfangsstadium der Koagulation. So geben die letzteren Autoren an, daß nur kurz gekochtes Albumin, in NaCl gelöst, die Eigenschaft von genuinem Albumin besitze, d. h. bei isoelektrischer Reaktion koaguliere, daß aber ein Kochen von mehreren Minuten genüge, um das Albumin irreversibel zu verändern. Hingegen muß nochmals darauf verwiesen werden, daß das hier verwendete Albumin [illegible] Minuten hindurch bei Siedehitze gehalten worden ist. Ebenso enthält die diesbezügliche Angabe von *Hoppe-Seyler* nebst einer Einschränkung der Höhe der Denaturierungstemperatur eine solche über die Dauer ihrer Einwirkung.

Im Gegensatz zu den oben vorgebrachten chemischen Ansichten über die Möglichkeit einer allgemein durchführbaren Rückverwandlung des hitzedenaturierten Albumins in sein Ausgangsmaterial ist es interessant, festzustellen, daß immunbiologische Erfahrungen bereits diese Deutung erfahren haben.

Schmidt begnügt sich mit der Feststellung, daß „der Tierorganismus fähig ist, die durch Hitze, Alkalien, Enzyme veränderten, augenscheinlich bis zur völligen Inaktivierung denaturierten Eiweißstoffe derartig zu verarbeiten, daß der Charakter der nativen Eiweißkörper wieder zum Ausdruck kommt", und möchte fast annehmen, daß im Tierkörper eine Art Regeneration der dem nativen Eiweiß eigenen Gruppen stattfindet. So konnten *Wells* und *Lewis*[2]) zeigen, daß durch Hitze koaguliertes und gewaschenes, also von anhaftenden, der Denaturierung entgangenen löslichen Eiweißteilen befreites Pferdeserum und ebensolches Eiereiweiß, in die Bauchhöhle von Meerschweinchen gebracht, sich in genügender Menge leisten, um die Tiere auch gegen homologes, nicht koaguliertes Eiweiß zu sensibilisieren. Die beiden Autoren schließen daraus, daß die Hitzekoagulation wahrscheinlich reversibel sei, und daß ein so gelöstes Eiweiß nichts von seinem charakteristischen immunbiologischen Antigencharakter verloren habe.

Im Zusammenhang mit den vorliegenden Befunden sei auf die Möglichkeit verwiesen, daß das nach länger dauernder Immunisierung mit gekochtem Eiweiß auftretende Fällungsvermögen des Immunserums gegenüber dem genuinen homologen Protein (*Pick* und *Obermayer*), das als durch kumulative Wirkung von kleinen, der Hitze-

---

[1]) *Corin* und *Ansiaux*, Bull. de l'Acad. roy. de Belg. 21.
[2]) l. c.

denaturierung entgangenen Eiweißmengen bedingt gedeutet wur vielleicht ebenfalls auf einer im Tierorganismus stattfindenc teilweisen Rückverwandlung des denaturierten Proteins beruh könnte.

Versuchen wir nun, das hier über das Verhalten von denaturiert Albumin Festgestellte für eine Beurteilung der bei der Hitzeder turierung am Eiweißmolekül hervorgebrachten Veränderung hera zuziehen, so ist es klar, daß die physikalisch-chemische Analyse wed direkte noch eindeutige Beweise für die Existenz einer bestimmt chemischen Veränderung geben kann. Auch soll das hier Vorgebrach nur in Beziehung zu der in den einleitenden Worten dieser Arb gegebenen Alternative, ob der Vorgang der Hitzedenaturierung a Ringschluß oder Hydrolyse am Eiweißmolekül beruhe, herangezog werden. Nachdem nun hier gezeigt worden ist, daß die durch Hit gesetzten Veränderungen durch kleine Laugen- oder Säuremenge rückbildbar sind, scheint der Annahme eines bei Hitzeveränderun erfolgenden Ringschlusses mehr Wahrscheinlichkeit zuzukomme Denn da die Wirkung dieser Zusätze, welche auch nach elektrodialyt scher Beseitigung derselben bestehen bleibt, im Sinne einer Hydrolys gedacht werden kann, so wäre es immerhin möglich, wenn ein be stehender Ringschluß durch dieselbe wieder gelöst wird. Hingegen ist es nicht einzusehen, wie eine stattfindende Hydrolyse durch gewisse ein Fortschreiten derselben begünstigende Zusätze zum ursprünglichen Ausgangszustand zurückgeführt werden kann. Die vorliegenden Befunde scheinen demnach für die Auffassung zu sprechen, daß die bei der Hitzedenaturierung des Proteins auftretende Veränderung auf einem Ringschluß der endständigen Gruppen beruhe. Ob nun die nach gewiesene Empfindlichkeit des hitzegefällten Albumins gegenüber denaturierenden Einflüssen relativ größerer Alkalimengen — analoge Versuche mit genuinem Albumin zeigen nach Elektrodialyse keine Veränderung desselben — auf den besonderen, durch den hypothetischen Ringschluß allein bedingten Eigenschaften des hitzedenaturierten Albumins beruht oder durch andere, ebenfalls bei geringfügiger Hydrolyse rückgängig zu machenden Veränderungen bedingt sind, kann hier nicht entschieden werden.

Nicht uninteressant erscheinen die vorstehenden Betrachtungen über die wahrscheinliche Art der Veränderungen am Eiweißmolekül durch Hitzeeinwirkung und die Rückverwandelbarkeit unter Laugen- eventuell Säurezusatz für die Beurteilung des Albumins als präzipitable Substanz.

Aus dem hier vorgebrachten Material ist jedenfalls hervorgegangen, daß die spezifische Präzipitierbarkeit des Serumalbumins Veränderungen durchmacht. Diese verlaufen zu den Modifikationen parallel, welche

dieses Protein unter dem Einfluß der Hitzeeinwirkung und der Prozesse, die zum Verschwinden derselben führen, durchmacht. Obwohl man nicht mit voller Sicherheit zu entscheiden vermag, ob die Veränderungen der spezifischen Präzipitierbarkeit und die Löslichkeit des hitzegefällten Albumins durch dieselbe Modifikation am Eiweißmolekül hervorgerufen werden, so lassen die vorliegenden Erfahrungen wohl die Auslegung zu, daß beim Erhitzen des Albumins die sonst mit dem Präzipitin unter Fällung reagierenden Gruppen nicht zerstört, sondern auch für das letztere unangreifbar gemacht worden sind[1].

Diese die Inaktivierung der präzipitablen Substanz bedingende Veränderung wäre demnach auf chemischem Wege rückgängig zu machen. Aus diesen Betrachtungen dürfte hervorgehen, daß die Versuche, die Stelle der einsetzenden Hitzeveränderung am Eiweißmolekül zu lokalisieren, gleichzeitig imstande wären, uns über diejenigen Gruppen desselben aufzuklären, welche sich an der spezifischen Präzipitation beteiligen.

Schließlich sei hier noch auf die im Zusammenhang mit der Darstellung „künstlichen Globulins" aus Albumin interessierende Tatsache hingewiesen, daß bei der Denaturierung des hitzekoagulierten Albumins mit Lauge oder Säure, bei Verwendung relativ geringer Mengen der letzteren salzlösliche Produkte erhalten werden können, während das bei erhöhtem Alkalizusatz erzielte salzunlösliche Produkt als Alkalialbuminat aufgefaßt wird. *Starke*[2] und *Moll*[3] haben unter gewissen Verhältnissen, nämlich bei kombinierter Alkali- und Wärmeeinwirkung, das Entstehen salzlöslicher Produkte beschrieben und dieselben als Globuline angesprochen. Ohne nun auf die Frage der Globulinbildung hier näher einzugehen zu wollen (welche an anderer Stelle ausführlich berücksichtigt werden soll), sei nur das Phänomen selbst erwähnt. Die vorliegenden Versuche haben die *Moll*schen Resultate am Serumalbumin insofern bestätigt, als dieser Autor zum Entstehen des von ihm beschriebenen Produkts sowohl Hitze- als Alkalieinwirkung für erforderlich hält. Sie zeigen aber, daß die Hitze von der Alkaliwirkung getrennt werden kann und daß durch Reaktion des hitzegefällten Produkts mit wechselnden Alkalimengen alle Stadien von einem wasserlöslichen, von dem ursprünglich genuinen Ausgangsmaterial nicht unterscheidbaren Protein über salzlösliches Material zu salzunlöslichen Produkten führt. Da die in letzterem Falle verwendeten Laugenmengen genuines Albumin bei Zimmertemperatur vollständig un-

---

[1] Inwiefern dieselben den labilen Gruppen *Eisenbergs*, Zentralbl. f. Bakt. 31, 1902, entsprechen, kann hier weiter nicht entschieden werden.
[2] *Joh. Starke*, Zeitschr. f. Biol. 40, 494, 1900.
[3] *L. Moll*, Hofmeisters Beitr. 7, 311, 1905.

verändert lassen, so ist es fraglich, ob das bei Behandlung von hi
verändertem Albumin entstandene salzunlösliche Produkt als Alk
albuminat im gewöhnlichen Sinne anzusprechen ist und ob n
außerdem berechtigt ist, die salzlösliche Fraktion, wie es z. B. A
getan hat, als selbständigen Eiweißkörper herauszugreifen. W
erscheint derselbe in dem vorliegenden besonderen Falle als Zwisch
stufe zwischen wasserlöslichem und unlöslichem Protein. Doch
statten die vorliegenden, im Rahmen der Globulinuntersuchungen
ergänzenden Befunde vor der Hand nur die Feststellung, daß au
den Globulinen unter quantitativ bestimmbaren Voraussetzung
auch Derivaten des hitzekoagulierten Seralbumins Salzlöslichk
zukommt.

III.

Zu ähnlichen Ergebnissen haben auch die Untersuchungen a
hitzegefällten *Eialbumin* geführt.

Es war naheliegend, die vorgebrachten Versuche an hitzegefällte
Seralbumin durch entsprechende am Eialbumin zu ergänzen. Unt
Beobachtung des gleichen Laugen-Eiweißverhältnisses wurde hitz
gefälltes Eialbumin ohne vorheriges Trocknen desselben unter zweim
zehnstündigem Schütteln teilweise gelöst. Der Trockengehalt dies
Lösung betrug 1,7 Proz., dieselbe war wohl im Gegensatz zum en
sprechenden Seralbuminpräparat trübe und nur in dünnen Schichte
durchscheinend, aber vollkommen stabil. Elektrodialysiert fiel da
Eiweiß jedoch quantitativ aus, desgleichen bei Neutralisation. Da
Entstehen einer wasserlöslichen Modifikation des hitzegefällten E
albumins bei der Behandlung mit Lauge konnte somit im Gegensat
zum Seralbumin unter den gleichen Versuchsbedingungen nich
beobachtet werden. Hingegen zeigte das hitzegefällte Eialbumin i
alkalischer Lösung nach Neutralisation desselben in Gegenwart vo
Salzüberschuß das typische Verhalten von Globulinlösungen unte
gleichen Verhältnissen. So werden die Salzlösungen von hitzeve
ändertem Eialbumin durch Verdünnung mit Wasser ebenso gefäll
wie die entsprechenden Globulinlösungen, desgleichen durch Einleite
von CO_2, durch Zusätze von HCl, die zur Wiederlösung nicht ausreichen
Drittelsättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ ruft weitgehende, Halbsättigung voll
ständige Fällung hervor.

Die Übereinstimmung im Verhalten des Globulins und des hitze
gefällten Eialbumins erstreckt sich auch auf die Veränderung de
potentiometrisch gemessenen H-Ionenkonzentration in Salzlösunge
bei steigender Verdünnung. Während bereits in dieser Arbeit gezeig
werden konnte, daß Seralbumin unter entsprechenden Versuchs
bedingungen eine Verminderung der H-Ionen aufweist, nimmt in
n/10 KCl-Lösungen des hitzeveränderten Eialbumins die Acidität

...so zu, wie in den bezüglich ihres Salzgehalts vergleichbaren Globulin-...ngen. In Tabelle XVIII sind zur leichteren Vergleichbarkeit zwei ...the Verdünnungsreihen nebeneinander gestellt, außerdem werden ...h Versuche gebracht, in welchen die Eiweißkonzentration konstant ...lten wurde. Schließlich geht aus der letzten Versuchsreihe, der ...ähnliche in Globulin VII[1]) entspricht, hervor, daß die beobachtete ...heinung nicht allein durch die relativ hohe Salzkonzentration ...ngt ist, sondern von der exakten Neutralisation des Na-Proteins ...einer Neutralsalzverbindung abhängig ist.

Tabelle XVIII.

...nung ...asser	0,1 n KCl-h***)-Eialbumin	0,1 n KCl-Globulin	0,2 n KCl-h-Eialbumin 20 mal mit 0,2 KCl verdünnt	0,0008 n Na-h-Ei-albumin + KCl, Salz-endkonz. 0,102 n
	$C_H = 5{,}3 \cdot 10^{-6}$	$C_H = 5{,}76 \cdot 10^{-6}$	$C_H = 2{,}13 \cdot 10^{-6}$	$C_H = 1{,}18 \cdot 10^{-6}$
:1	$C_H = 7{,}28 \cdot 10^{-6}$	$C_H = 7{,}79 \cdot 10^{-6}$		$C_H = 9{,}65 \cdot 10^{-7}$
1:3	C_H *) $= 8{,}88 \cdot 10^{-6}$	C_H *) $= 9{,}39 \cdot 10^{-6}$		
1:7				$C_H = 4{,}92 \cdot 10^{-7}$
1:19			C_H **) $= 1{,}17 \cdot 10^{-5}$	

*) Beginnende Fällung. — **) In der überstehenden klaren Flüssigkeit. — ***) h = hitze-...ändertes.

Schließlich konnte noch gezeigt werden, daß hitzeverändertes ...lbumin in KCl-Lösungen ein ganz ähnliches Verhalten bei Über-...rungsversuchen im elektrischen Strome aufweist wie Globulin ...ter vergleichbaren Verhältnissen. Wie dieses wandert das hitze-...änderte Eialbumin kathodisch (vgl. Tabelle XIX). Aus dem hier ...rgebrachten würde danach hervorgehen, daß die Übereinstimmung ...n Verhalten von Globulin und hitzegefälltem Albumin sich recht ...itgehend auf das physikalisch-chemische Verhalten derselben bei ...nwesenheit von Neutralsalz erstreckt. Auf die Bedeutung dieser und ...nlicher Erscheinungen ist bereits an anderer Stelle dieser Arbeit ...ngegangen worden, auf welche hier verwiesen wird.

Tabelle XIX.

Eiweißtrockengehalt in allen Versuchen 0,85 Proz.

Salz-...konzentration	Versuchsanordnung	Wanderungssinn	Anmerkung
...2 n KCl . .	Überschichtet mit 0,2 n KCl, 100—60′	K + A —	Nachweis durch Sulfosalicylsäure
...2 n KCl . .	Wie oben 38′	K + A —	
...1 n KCl . .	Überschichtet mit 0,1 n KCl, 50—30′	K + A —	

[1]) *M. Spiegel-Adolf*, Kolloidchem. Beih. **21**, 241, 1926.

Starke hat, wie oben bereits erwähnt worden ist, gezeigt, daß Erhi
von Hühnereiweiß unter Beobachtung gewisser Bedingungen, als da s
sehr geringe Salzkonzentration, leicht alkalische Reaktion und Erwärm
auf 56° zum Entstehen eines globulinähnlichen Produktes führt. Von die
hebt nun *Starke* besonders hervor, daß es noch kein koaguliertes Eiweiß
(nach der Löslichkeit), wohl aber durch Erhitzung auf 95° mit Neu
salzen seine Löslichkeit in Säuren oder Alkalien verliert. Es konnte
gezeigt werden, daß die gleiche Erscheinung zu beobachten ist, wenn
Eialbumin mit geringen Mengen von $(NH_4)_2SO_4$ erhitzt wird. Dann v
ein Produkt gebildet, das in n/100 NaOH unlöslich ist.

Aus dem hier Vorgebrachten geht einerseits die Ähnlichkeit
Verhaltens der Lösungen des hitzegefällten Albumins mit den *Sta*
schen Körpern hervor, andererseits scheint Neutralsalzgegenwart ni
nur für das Zusammentreten von denaturierten Eiweißteilchen, sond
auch für die Beschaffenheit des bei der Hitzeeinwirkung entstehend
Koagulats von Bedeutung zu sein, was in guter Übereinstimmung
den diesbezüglichen Untersuchungsergebnissen am Globulin steht.

IV.

Im folgenden seien einige Versuche wiedergegeben, die zu de
Zwecke angestellt worden waren, um die Frage der Hitzeveränderu
von Serum- und Ovalbumin in Laugen- oder Säuregegenwart mit u
ohne Salzzusatz zu untersuchen. Schon in der Mitteilung über d
Hitzeveränderung des Globulins war auf die Diskrepanz zwischen de
diesbezüglichen Resultaten am Globulin und den in der Literat
niedergelegten Erfahrungen am Säure- und Laugenalbumin hingewies
worden. Während neutrale Lösungen von Säure- oder Laugenglobul
nach dem Erhitzen und Neutralisieren keine physikalisch-chemis
faßbaren Veränderungen aufwiesen, faßt *Cohnheim* die Ergebnisse v
Starke, Pauli und besonders *Erb*[1]) dahin zusammen, daß „Denaturieru
der Eiweißkörper durch Erhitzen bei jeder Reaktion mit und oh
Salze eintritt, daß aber die Schicksale des entstandenen denaturiert
Eiweißes verschieden seien". Nachdem nun die Frage nach der Hitz
veränderung der Proteinsalze, wie aus der erwähnten früheren Mitteilu
hervorgegangen ist, von Bedeutung für die Auffassung der Hitz
veränderung am Eiweißmolekül geworden ist, mußten entsprechend
Versuche auch am Albumin ausgeführt werden.

Da bekanntlich die Reaktionsprodukte zwischen Albumin un
Säuren und Alkalien unter vergleichbaren Verhältnissen verschiede
sind, soll im folgenden das Verhalten von Albumin beim Erhitzen be
saurer und alkalischer Reaktion zunächst getrennt behandelt werden
Es erfolgt zunächst die Besprechung der Experimente am Ser
albumin.

---

[1]) *Erb*, Zeitschr. f. Biol. 41, 309, 1901.

In allen Versuchen wurde das Albumin mit dem betreffenden Elektro-
... auf dem Drahtnetz 10 Minuten hindurch zum Kochen erhitzt, als
...ikator für eine etwa stattgehabte Veränderung des Proteins wird die
...erlöslichkeit desselben nach elektrodialytischer Entfernung des ur-
...nglichen Elektrolytzusatzes verwendet. Nachdem in Kontrollversuchen
...igt werden konnte, daß genuines Albumin bei der gleichen Behandlung
...rändert bleibt, erscheint diese Methode der von *Michaelis* verwendeten
...tralisation und Herbeiführung isoelektrischer Reaktion überlegen.
...n dieser Autor weist selbst auf die Möglichkeit einer Beeinflussung
... nach seinem Verfahren erzielten Resultate durch die Gegenwart von
...ralsalzen hin. Und der oben erbrachte Nachweis von der Existenz
...öslicher Eiweißkörper bei der Behandlung von hitzekoaguliertem
...umin mit Lauge scheint diesen Verdacht zu bekräftigen.

Bei konstantem Albumingehalt wurde zunächst jene Salzsäure-
...nge bestimmt, welche imstande ist, sichtbare Veränderungen des
...eißes beim Kochen zu verhindern. Für die eigentlichen Versuche
...rden jedoch außer diesen Minimalquantitäten Säuremengen ver-
...ndet, die nach früheren Erfahrungen am Laboratorium noch gerade
... der anwesenden Eiweißmenge gebunden werden. Es geschah dies,
... einen etwaigen Eiweißüberschuß zu vermeiden und Verhältnisse
...rzustellen, die mit denjenigen der Globulinsalze vergleichbar scheinen.
Um aber auch den möglichen Einfluß von im Säureüberschuß ge-
...ndener Säure und freier H-Ionen festzustellen, wurde die Säure-
...nzentration variiert. Nebst HCl wurden, um für Säuren allgemein
...ltige Resultate zu gewinnen [vgl. Globulin II[1])], auch H_2SO_4 und
CH_3COOH herangezogen. Die so gewonnenen Resultate sind in
Tabelle XX zusammengestellt. Aus denselben ist zu entnehmen, daß
... keinem der untersuchten Fälle das in Säuregegenwart gekochte
Albumin vollständig in eine wasserunlösliche Modifikation übergeführt
wird. Mit zunehmender Säurekonzentration nimmt die Menge der-
selben ab, um bei weiterem Säurezusatz wieder zuzunehmen. Im
experimentell bestimmten Minimum des wasserunlöslichen Proteins
sind mehr als 90 Proz. des Ausgangsmaterials wasserlöslich und hitze-
koagulabel[2]). Versuche mit H_2SO_4 und CH_3COOH zeigen ein ähn-
liches Verhalten. Bei Neutralisation der erhitzten sauren Lösung nach
vollständiger Abkühlung tritt erst nach einigen Stunden eine wahr-
nehmbare Trübung auf, welche jedoch in der höchsten verwendeten
Säurekonzentration ausbleibt. Vielleicht genügt die bei der Neu-
tralisation gebildete Salzmenge, um das wasserunlösliche Produkt
in Lösung zu erhalten; dies ist um so leichter annehmbar, da die ver-

---

[1]) *M. Adolf*, Kolloidchem. Beih. 18, 223, 1923.

[2]) In der nach Abschluß dieser Untersuchung mir bekannt gewordenen Arbeit von *Wu, Hsien* und *D. Y. Wu* findet sich die Angabe, daß 0,5proz. Pferdeserum, mit 0,05 n HCl erhitzt, der Denaturierung entgehe, indem es wieder hitzekoagulabel gemacht werden kann.

wendete Eiweißkonzentration eine niedrige ist. Diese bereits
Michaelis und *Rona* gemachte Annahme wird noch durch die Tats
unterstützt, daß Neutralsalzzusätze die Fällung in den niederen Sä
konzentrationen bei Neutralisation zu verhindern vermag. D
Ergebnisse zeigen einerseits eine gewisse Übereinstimmung mit
Befunden von *Michaelis* und *Rona*, wonach Albumin, in Gegenw
stärkerer Säuremengen erhitzt, kein Neutralisationspräzipitat g
Andererseits sind sie vereinbar mit den Erfahrungen über die I
stellung von Acidalbumin[1]). In einer früheren Mitteilung wurde
gegeben, daß bei Verwendung einer Salzsäure von 0,04 n Endkonz
tration und einem Eiweißgehalt von über 1 Proz. nach Erhitz
Neutralisieren und Abfiltrieren des Niederschlags, bei neuerlich
entsprechenden HCl-Zusatz der Prozeß zwei- bis dreimal wiederl
werden konnte, bis das gesamte lösliche Eiweiß in Acidalbumin v
wandelt war.

Tabelle XX.

Ursprüngliche Albuminkonzentration überall 0,53 Proz.

	0,0013 n		0,0026 n		0,005 n		0,01 n		0,02 n		0,04 n	
	lösliches Albumin	Proz. des ursprüngl.	lösliches Albumin	Proz. des ursprüngl.	lösliches Albumin	Proz. des ursprüngl.	lösliches Albumin	Proz. des ursprüngl.	lösliches Albumin	Proz. des ursprüngl.	lösliches Albumin	[illegible]
HCl	0,15	28	0,44	83	0,49	92	0,4	75			0,3	[illegible]
H_2SO_4					0,40	77			0,4	75		
CH_3COOH .							0,4	75				

Dennoch dürfte im Hinblick auf die oben registrierten Erfahrung
die hier angegebene Fällung des Acidalbumins mittels Elektrodialy
dem üblichen Neutralisationsverfahren vorzuziehen sein. Gleichzeit
bietet diese Übereinstimmung zwischen den vorliegenden, an reinste
Albumin gewonnenen Resultaten mit den früheren, zu welchen we
gehend dialysiertes, durch Jahre abgelagertes Rinderserum verwend
worden ist, eine gewisse Gewähr dafür, daß die Erscheinung der Aci
albuminbildung nicht etwa ausschließlich durch Globulinreste in d
Lösung vorgetäuscht wird.

Versuchen wir nun, die vorliegenden Resultate mit den en
sprechenden am Globulin zu vergleichen, so zeigt sich, daß dieselb
eine gewisse Übereinstimmung aufweisen. Bei einem Verhältnis zwisch
Albumin und HCl, welches nach den Ergebnissen von *Manabe* un
Matula[2]) der Zusammensetzung eines neutralen Salzes insofern en

[1]) *M. Adolf* und *E. Spiegel*, diese Zeitschr. **104**, 175, 1920.
[2]) *K. Manabe* und *J. Matula*, ebendaselbst **52**, 369, 1913.

punkt, als praktisch die gesamte HCl gebunden erscheint, bei welchem
der kein Eiweißüberschuß anzunehmen ist, da weiterer HCl-Zusatz
i einem Anstieg der H-Ionen führt, weisen 90 Proz. des Eiweißes
am Gekochtwerden keine nachweisbaren Veränderungen auf. Die
a geringeren und höheren Säurekonzentrationen beobachtete Zunahme
s bei der Denaturierung auftretenden wasserunlöslichen Produkts
ht in keinem Gegensatz zu den am Globulin gemachten Befunden,
e unter anderen, zum Teil durch die Verwendung wasserunlöslichen
teins gegebenen Bedingungen ausgeführt worden sind. So kann
s Entstehen größerer Mengen unlöslichen Proteins bei Verwendung
niger Säurekonzentrationen dadurch erklärt werden, daß noch nicht
e endständigen NH_3-Gruppen mit Säure verbunden und daher der
zeeinwirkung zugänglich sind, während das wasserunlösliche Globulin
r als Säuresalz der Hitzeeinwirkung unterworfen werden konnte.
e Zunahme des wasserunlöslichen Anteils bei Verwendung höherer
urekonzentrationen, welche beim Globulin nicht herangezogen
rden sind, müßte als Folge der Einwirkung hoher Temperatur bei
ureüberschuß auf das Albuminsalz gedeutet werden.

Es dürfte nach dem Gesagten nichts im Wege stehen, die dem
rhalten des neutralen Globulinchlorids beim Erhitzen gegebene
utung auch auf das Albumin unter vergleichbaren Umständen zu
ertragen und anzunehmen, daß auch beim Albumin das Auftreten
ogener endständiger Gruppen durch Säurebindung nicht nur das
chtbarwerden, sondern den Eintritt von Veränderungen überhaupt
im Erhitztwerden verhindert.

Erhitzen wir nun Albumin in NaOH-Gegenwart bei mit der obigen
nau vergleichbarer Versuchsanordnung, so zeigt sich insofern eine
itgehende Übereinstimmung mit den Säurealbuminversuchen, als
ch bei einem bestimmten Verhältnis zwischen Lauge und Albumin
s letztere beim Erhitzen wenigstens teilweise der Denaturierung
tgeht. Während jedoch beim Säurealbumin das Konzentrations-
reich der Säure, innerhalb welcher noch wasserlösliches Albumin
ch dem Erhitzen erhalten wird, relativ breit ist, es erstreckt sich
n etwa 0,001 n bis über 0,04 n hinaus, ist die entsprechende Zone beim
augenalbumin beträchtlich enger. Bei gleicher Eiweißkonzentration
rmag 0,001 n NaOH die Hitzeveränderung des Albumins beim
ieden nicht gänzlich aufzuhalten, und schon bei 0,003 n Endkonzen-
ation ist der größte Teil des Albumins wasserunlöslich geworden.
Bei einer Laugenkonzentration, die von der anwesenden Eiweißmenge
llständig gebunden wird, erfährt das gesamte Albumin beim Erhitzt-
erden derartige Veränderungen, daß dasselbe bei der nachfolgenden
Elektrodialyse vollständig ausfällt. Steigende Laugenmengen ändern
ichts an diesem Verhalten (vgl. Tabelle XXI).

Tabelle XXI.

0,53proz. Albuminendkonzentration.

NaOH-Endkonzentration	θ	0,001 n	0,002 n	0,003 n	0,005 n	0,02 n	0,(
Verhalten beim Sieden	×××	++	θ	θ	θ	θ	(
Gekocht und elektrodialysiert			0,36 Proz. wasserlösl.	>0,01 Proz. wasserlösl.	vollst. Fällu		

Die Schmalheit des die Albumindenaturierung teilweise ve
hindernden Laugenkonzentrationsbereichs erklärt z. B. die Angal
von *Michaelis* und *Rona*, daß nur Säure-, nicht aber Laugenzusa
bei nachträglicher Neutralisation unter gewissen Verhältnissen :
einem wasserlöslichen Produkt führen kann. Bezüglich des Umstand
daß Wasserunlöslichwerden des Albumins schon bei Laugenkonzei
trationen auftritt, die noch praktisch vom Albumin vollständig g
bunden werden, sei darauf hingewiesen, daß *Pauli*[1]) zum Teil nac
Versuchen über Methylierung von Eiweißkörpern außer den freie
Carboxylgruppen, besonders die Peptidbindung als Stellen der Laugei
fixierung annimmt. Die obigen Versuchsergebnisse würden dann di
Deutung erfahren, daß auch beim Laugenglobulin die ionogene Bindun
der endständigen Gruppen die Hitzeveränderung verhindern kann, da
aber Zusatz weiterer Laugenmengen, trotzdem dieselben vom Albumi
weitgehend gebunden werden, beim Erhitzen ein Unlöslichwerde
desselben bewirken. Es wurde versucht, diese Überlegungen durc
weitere Versuchsergebnisse zu stützen.

Den zu diesem Zwecke ausgeführten Experimenten lagen folgend
Überlegungen zugrunde: Bedeutet das Unlöslichwerden des in Laugen
gegenwart erhitzten Albumins, daß ionogene Bindung der endständige
Carboxylgruppen nicht imstande sei, die Hitzeveränderung des Albumin
zu verhindern, so müßte das so entstandene Produkt identisch sei
mit demjenigen, welches unter quantitativ genau vergleichbaren Ve
hältnissen bei der Behandlung von hitzekoaguliertem Albumin mi
NaOH entsteht. Der entsprechende Versuch — Erhitzen zum Siede
von Albumin mit Laugenzusatz, Abkühlen, Neutralisieren mit HC
Abfiltrieren des Niederschlags, Waschen und Auflösen desselben i
NaOH — zeigte nun, daß das so entstandene Produkt bei nachfolgende
Elektrodialyse quantitativ ausfiel, während die Lösung eine ent
sprechende Menge von hitzekoaguliertem Albumin in Lauge zu 72 Proz
wasserlösliches Protein enthielt. Es muß somit angenommen werden, da
selbst in Abwesenheit freier Hydroxylionen es beim Erhitzen vo

[1]) l. c.

Albumin mit Lauge zu einer von einfacher Hitzedenaturierung verschiedenen Veränderung des ersteren, etwa im Sinne einer Alkalialbuminatbildung kommt. Bis zu einem gewissen Grade bleiben jedoch die Versuche am Laugenalbumin mit den entsprechenden am Säurealbumin und mit den Globulinversuchen vergleichbar. Sie dürften aber auch nicht geeignet sein, einen Einwand gegen den hier als möglich angenommenen Mechanismus der Hitzeveränderung am Eiweiß zu bilden.

Hingegen zeigten entsprechende Versuche am Eialbumin, deren Ergebnisse in Tabelle XXII zusammengestellt worden sind, daß dieser Körper ein vom Seralbumin verschiedenes Verhalten aufweist. Schon in jenen Säuren- und Laugenkonzentrationen, bei welchen, entsprechend früheren Erfahrungen in den betreffenden Eialbuminlösungen die Menge der freien H- bzw. OH-Ionen noch gering ist, erweist sich das gesamte Albumin nach Erhitzen und Elektrodialyse als wasserunlöslich.

Tabelle XXII.

1,2 proz. Eialbuminendkonzentration.

HCl-Endkonzentration	0,0025 n	0,005 n	0,01 n
Verhalten beim Sieden	××	θ	θ
Gekocht und elektrodialysiert		vollständige Fällung	
NaOH-Endkonzentration	0,003 n	0,004 n	0,005 n
Verhalten beim Sieden	××	θ	θ
Gekocht und elektrodialysiert		vollständige Fällung	

Zum Vergleich wurden die entsprechenden Untersuchungen auch am Eialbumin mit den gleichen Säuren- und Laugenzusätzen ausgeführt. Nachdem bei dieser Versuchsanordnung das Eialbumin wasserlöslich blieb, erscheint es nicht berechtigt, die obigen Versuchsergebnisse etwa als Wirkung der Elektrodialyse aufzufassen.

Die bereits bei der Hitzefällung im elektrolytfreien Medium in der Verschiedenheit des Koagulats zutage getretenen Differenzen im Verhalten des Ser- und Ovalbumins kommen ebenfalls bei dem Vorgang der Hitzeveränderung in Säure- und Laugengegenwart zur Beobachtung.

Dabei muß aber festgestellt werden, daß das in Gegenwart von Säure und Lauge erhitzte Eialbumin sich durch seine mangelnde Salzlöslichkeit bei Neutralisation von dem im elektrolytfreien Medium hitzegefällten Albumin merklich unterscheidet (Tabelle XXIII und XXIV).

Tabelle XXIII.

1proz. Eialbumin-Endkonzentration, mit Säure gekocht und neutralisi

HCl-Endnormalität	0,01 n		0,02 n		0,03 n	
KCl-Endkonzentr.	0	0,1 n	0	0,1 n	0	0,1 n
	×××	×××	×××	×××	×××	×·

Tabelle XXIV.

1proz. Eialbumin-Endkonzentration, mit Lauge gekocht und neutralisi

NaOH-Endnormal.	0,004 n		0,005 n		0,01 n	
KCl-Endkonzentr.	0	0,1 n	0	0,16 n	0	0,33 n
	×××	×××	×××	×××	×××	××

Ergänzend zu den bereits an mehreren Stellen erwähnten V suchen über die Salzlöslichkeit verschiedener Produkte der Hit fällung an Proteinen wurde auch das entsprechende Verhalten v Pferdeserumalbumin nach dem Kochen mit steigenden Säure- u Laugenkonzentrationen untersucht.

Tabelle XXV.

0,2proz. Serumalbumin-Endkonzentration, mit Säure gekocht und neutralisiert.

HCl-Endnormalität	0,01 n		0,02 n		0,05 n	
KCl-Endkonzentr.	θ	0,1 n	θ	0,1 n	θ	0,1 n
	θ	θ	++	θ	×××	θ

Aus Tabelle XXV geht hervor, daß in den niedrigsten Meng der HCl-Konzentration bei Neutralisation die Lösung äußerlich u verändert bleibt. Im Zusammenhang mit den obigen Untersuchung und der geringen, durch Säurekonzentration entstandenen Salzmen wird diese Erscheinung darauf zurückgeführt, daß bei den gewählt Versuchsbedingungen der größere Teil des Albumins der Denaturieru entgangen ist. Bei steigendem Säuregehalt hingegen verhindert n Zusatz von Neutralsalz das Ausfällen des bei der Elektrodialyse si als wasserunlöslich erweisenden Acidalbumins, das sich somit a neutralsalzlöslich herausstellt.

Tabelle XXVI.

0,2proz. Serumalbumin-Endkonzentration, mit Lauge gekocht und neutralisiert.

NaOH-Endnormalität.	0,01 n		0,02 n		0,04 n		0,05 n	
KCl-Endkonzentration	θ	0,1 n	θ	0,1 n	θ	0,1 n	θ	0,1 n
	×+++	×××	++	×××	++	××	++	××

Ein gänzlich verschiedenes Verhalten charakterisiert dagegen das agenalbumin. Aus den in Tabelle XXVI zusammengestellten Ver-hen wird ersichtlich, daß bei Verwendung steigender Mengen Lauge ter Entwicklung von H_2S beim Kochen Alkalialbuminate entstehen, deren In-Lösunghalten schließlich die bei der Neutralisation der uge entstehenden Salzkonzentrationen genügen. Erhitzt koagulieren se Lösungen erst wieder bei Salzzusatz und fallen erst bei Elektro-lyse quantitativ aus. Erfolgt jedoch die Neutralisation in Gegenwart 0,1 n Endkonzentration KCl, so wird das Alkalialbuminat im gensatz zu den übrigen salzlöslichen Proteinen gefällt. Diese Fällung in reinem Wasser nicht wieder löslich.

Die betreffenden Untersuchungen sollen seinerzeit fortgesetzt rden.

V.

Da somit die Feststellung der fehlenden Veränderung des in seinen nähernd neutralen Verbindungen mit Säure oder Laugen erhitzten rumalbumins trotz komplizierender Reaktionen erkennbar erscheint, mußte auch der Einfluß untersucht werden, den Neutralsalzzusatz geblich auf das Manifestwerden von stattgehabten Denaturierungen übt. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Versuche auch m Eialbumin ausgeführt.

Bezüglich des Albumins gilt die Anschauung, daß beim Erhitzen sselben mit Säure oder Alkali es in jedem Falle zu einer Veränderung s Proteins kommt, ein Ausfallen desselben durch die Säure- oder augengegenwart gehemmt wird, diese Hemmung durch die Anwesen-eit von Neutralsalzen mehr oder weniger aufgehoben wird. Einer öglichen Verallgemeinerung dieser Ansichten auf den Mechanismus er Hitzeveränderungen bei den übrigen Eiweißkörpern wurde auf rund der Versuche am Globulin entgegengetreten. Nachdem mit enselben der Nachweis erbracht worden war, daß Globulin, in seinen augen- und Säureverbindungen erhitzt, keine physikalisch-chemisch achweisbaren Veränderungen erfährt, konnte gezeigt werden, daß alzzusatz nur dann wirksam im Sinne einer Niederschlagsbildung eim Kochen ist, wenn derselbe vor dem Erhitzen der Lösung erfolgt. Diese Erscheinung wurde dahin gedeutet, daß im Gegensatz zu den infachen Globulinsalzen in wässeriger Lösung Neutralsalzgegenwart n dem Zustand des Globulinsalzes solche Veränderungen hervorrufe, laß Hitzelabilität entsteht, jedoch keine Anhaltspunkte biete, um beim Globulin eine Unterteilung der Hitzeveränderung in Denaturierung und Koagulation vorzunehmen.

Entsprechend den komplizierten Verhältnissen, welche Säure- und Laugenalbumin beim Erhitzen bieten, indem dieselben wasserlösliches

Albumin nebst Acid- oder Alkalialbumin, je nach den verwendet Konzentrationen in wechselnden Verhältnissen nebeneinander er halten, dürfte auch die Wirkung der Neutralsalze eine mehrfache sei Es handelt sich erstens, festzustellen, ob das wasserlösliche Album nicht doch gegenüber Neutralsalz Reaktionen aufweist, die von de jenigen des genuinen verschieden sind, und zweitens zu ermitteln, das Acid- und Alkalialbumin, welches durch Säure oder Alkali in Lösu gehalten wird, durch Salzzusatz allein oder erst bei neuerlichem E hitzen in dessen Gegenwart gefällt wird. Um nun möglichst übersicl liche Verhältnisse zu gewinnen, wurden sowohl beim Säure- als au beim Alkalialbumin Konzentrationen gewählt, bei welchen entwed die wasserlösliche Albuminmenge oder die unlösliche Modifikati maximal war. Da entsprechende Salzbindungsversuche nur für K zur Verfügung standen[1]) und eigene Untersuchungen auf diesem Gebie außerhalb des Rahmens dieser Arbeit fielen, so wurde im Gegensa zu den Globulinuntersuchungen nur dieses Salz herangezogen. D so erhaltenen Versuchsresultate sind in Tabelle XXVII und XXVI enthalten.

Aus denselben geht zunächst hervor, daß in keinem Falle ei Fällung eintritt, falls der Salzzusatz nach erfolgtem Erhitzen un Abkühlen erfolgt. Diese Ergebnisse sind einerseits in voller Übe einstimmung mit der in diesen Untersuchungen gemachten Annahm daß das nach dem Erhitzen wasserlöslich gebliebene Albumin mit de genuinen identisch sei, da auch dieses bei den verwendeten Salzkonze trationen keine Veränderungen aufweist. Andererseits zeigen die Versuche, daß Acid- und Alkaliseralbumin sich Neutralsalz gege über ähnlich wie Globulin verhalten. Erfolgt jedoch der KCl-Zusa vor dem Erhitzen der Lösung, so tritt Fällung derselben unter b stimmten Versuchsbedingungen ein, die entsprechend den *Pauli*schen Befunden an Säurealbumin bei konstantem Eiweißgehalt von de Salz : Säure- bzw. Salz : Laugenverhältnis abhängig sind. Dana lassen sich die vorliegenden Versuchsergebnisse dahin zusammenfasse daß der bei Salzzusatz beim Erhitzen erfolgende Fällungsmechanism nicht auf dem Manifestwerden einer stattgehabten Denaturieru beruht, nachdem das Albumin überhaupt nicht verändert worden i oder das veränderte Produkt nicht durch Salzzusatz gefällt wird. D fällende Wirkung von Salzgegenwart kann auch nicht allein auf d durch Salzgegenwart bedingten Änderung der H-Ionenaktivität b ruhen, da dieselbe in gleicher Weise beeinflußt werden muß, ob nun d Salzzusatz vor oder nach dem Erhitzen erfolgt. Aus den gleiche

---

[1]) *K. Manabe* und *Joh. Matula*, l. c.
[2]) l. c.

Gründen muß auch eine Erklärung der Erscheinung durch die Entstehung einer unlöslichen doppelsalzartigen Verbindung zwischen dem Salze des denaturierten Albumins und dem Neutralsalz[1]) abgelehnt werden. Die Versuchsergebnisse scheinen vielmehr darauf hinzudeuten, daß in Analogie zum Globulin zum Entstehen der Hitzefällung bei Neutralsalzgegenwart in Säure- und Alkalialbuminlösung die erst durch den Säureeinfluß hervorgerufene Hitzelabilität der Albuminsalze notwendig ist. Nach den hier beschriebenen Befunden ist es daher auch beim Säure- und Laugenalbumin nicht möglich, in dem bis jetzt verwendeten Sinne von einer unter allen Umständen in Säure- und Laugengegenwart stattfindenden Denaturierung des Albumins und einem Manifestwerden derselben bei Salzzusatz zu sprechen. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß bei geeigneter Eiweiß- und Säure- oder Laugenkonzentration Veränderungen beim Erhitztwerden entweder gänzlich ausbleiben oder die entstehenden Denaturierungsprodukte von denjenigen der reinen Hitzekoagulation verschieden sind. Da Salzzusatz nur vor der Erwärmung hinzugefügt

Tabelle XXVII. 0,53 proz. Albumin-Endkonzentration in allen Versuchen.

K Cl-Konzentr.	0,02 n		0,04 n		0,05 n		0,066 n		0,075 n		0,1 n		0,2 n		0,3 n		0,5 n	
	a*)	p**)	a	p	a	p	a	p	a	p	a	p	a	p	a	p	a	p
0,0024 n HCl	+	θ	++	θ	+++	θ	+++	θ	×××	θ	×××	θ	×××	θ	×××	θ	×××	θ
0,005 n „	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+++	θ	×××	θ	×××	θ
0,01 n „	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	+++	θ	×××	θ
0,04 n „	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	×××	θ

*) a = vor dem Erhitzen. — **) p = nach dem Erhitzen.

Tabelle XXVIII. 0,53 proz. Albumin-Endkonzentration in allen Versuchen.

K Cl-Endkonzentration	0,01 n		0,05 n		0,5 n		1,0 n	
	a	p	a	p	a	p	a	p
0,002 n NaOH .	θ	θ	+++	θ	×××	θ	×××	θ
0,003 n „ .	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ	θ

[1]) *Wo. Pauli*, l. c.

fällend wirkt, so kann dessen Wirksamkeit nur als die Reaktion e
dabei modifizierten Verbindung, nicht aber als Beweis einer st
gefundenen Denaturierung gelten. Aber selbst das anderweitig na
weislich veränderte Albumin wird bei der beobachteten Versu
anordnung durch Salzzusatz allein nicht gefällt, sondern koagul
erst bei nochmaligem Erhitzen. Dieses letztere Verhalten sch
sogar für das Denaturierungsprodukt des Seralbumins charakteristi
zu sein.

Tabelle XXIX.

1 proz. Eialbumin-Endkonzentration in jedem Versuch.

KCl-Endkonzentration . .	θ		0,16 n		0,33 n		0,5 n	
	a	p	a	p	a	p	a	p
0,003 n NaOH . .	++							
0,005 n „ . .			+	θ			+	θ
0,01 n „ . .			θ	θ	+	θ	+	θ

Tabelle XXX.

1 proz. Eialbumin-Endkonzentration in jedem Versuch.

KCl-Endkonzentration	θ		0,025 n		0,05 n		0,1 n		0,35 n	
	a	p	a	p	a	p	a	p	a	p
0,0025 n HCl . .	++									
0,005 n „ . .			θ	θ	+++	θ	+++	+++		
0,01 n „ . .					θ	θ	+++	θ*)	+++	++

*) Jeder einfallende Salztropfen verursacht eine vorübergehende Trübung.

Vergleichen wir nun mit den obigen Befunden diejenigen a
Eialbumin (Tabelle XXIX und XXX), so zeigt sich zwar bei d
Versuchen mit Laugen eine befriedigende Übereinstimmung mit d
entsprechenden Experimenten am Seralbumin. Salzzusatz erzeu
Fällung, falls er vor dem Erhitzen der Flüssigkeit erfolgt. Die Grö
seiner wirksamen Menge hängt von der vorhandenen Laugenkonze
tration ab. Doch selbst in geringen, gerade zur Verhütung einer sich
baren Veränderung beim Erhitzen hinreichenden NaOH-Konze
trationen reichen KCl-Endnormen bis 0,5 n, nach Erhitzen und Abkühl
der Flüssigkeit zugesetzt, nicht aus, um eine Trübung derselben hervo
zurufen. Hingegen geht aus den an salzsauren Lösungen von Ovalbumi
gemachten Versuchen hervor, daß bei diesem Eiweißsalz der Unte
schied der Wirksamkeit der vor und nach dem Erhitzen erfolgende
Salzzusätze nur ein quantitativer ist. Während bei Verwendung relati
niedriger Salzmengen in vorher erhitzten Säurealbuminlösungen d
einfallende Salztropfen eine sich in der übrigen Flüssigkeit rasch lösend

Trübung hervorruft, verursachen höhere Salzkonzentrationen bei Konstanz des Säuregehalts Fällung, gleichgültig, ob sie nun vor oder nach dem Erhitzen zugesetzt werden.

Vergleichen wir nun die Ergebnisse, welche die Untersuchung der Hitzeveränderungen am Globulin und am Seralbumin gezeitigt haben, so zeigt sich trotz gewisser Differenzen eine weitgehende Übereinstimmung und gegenseitige Ergänzung der Befunde; so konnte den Versuchsergebnissen beim Globulin zwanglos die Deutung gegeben werden, daß nur eine ionogene Bindung der endständigen Gruppen und nicht etwa eine durch nur im Überschuß existenzfähige Salzbindung vermittelte elektrische Ladung die bei Hitzeeinwirkung entstehenden Veränderungen verhindert. Beim Albumin konnten zwar unter besonderen Versuchsverhältnissen ähnliche Befunde erhoben werden, im allgemeinen waren dieselben durch sekundäre Reaktionen teilweise überdeckt. In der Globulinmitteilung wurde schließlich darauf hingewiesen, daß die erzielten Versuchsresultate am ehesten mit der Ansicht derjenigen Autoren vereinbar waren, die die der Hitzeveränderung zugrundeliegende Modifikation am Eiweißmolekül als einen Ringschluß der endständigen Gruppen auffassen. Diese Annahmen erfuhren nun durch die Ergebnisse am Seralbumin, wonach durch chemische Eingriffe die Hitzeveränderungen rückgängig gemacht werden können, eine erwünschte Unterstützung, da nur ein Ringschluß der endständigen Gruppen, nicht etwa eine hydrolytische Veränderung am Eiweißmolekül diese Tatsache erklären kann. Der beim Globulin erbrachte Nachweis, daß kein Anlaß besteht, bei den durch Hitzeeinwirkung hervorgerufenen Veränderungen Denaturierungsvorgänge von nachfolgender Koagulation zu unterscheiden, gilt auch für das in Alkali oder Säuregegenwart erhitzte Seralbumin, das entweder einer Veränderung entgeht oder ein von einem Hitzekoagulat verschiedenes Produkt liefert. Dementsprechend kommt der fällenden Salzwirkung in beiden Fällen die gleiche Deutung zu, indem der Nachweis erbracht wird, daß dieselbe nicht als Folgen einer sekundär bewirkten Koagulation primär veränderten Proteins anzusehen ist, sondern daß erst der Salzzusatz das Entstehen einer hitzeveränderlichen Verbindung herbeiführt.

Bei dieser weitgehenden Übereinstimmung im Verhalten von Globulin und Seralbumin bei Hitzeeinwirkung erschien es jedenfalls verlockend, zu untersuchen, wieweit die hier vorgebrachten Annahmen auf das Verhalten anderer Eiweißkörper übertragbar sind. Wir haben bereits gesehen, daß das Eialbumin unter den gleichen Versuchsbedingungen fast durchweg ein verschiedenes Verhalten aufweist. Da zeigte sich nun, daß Casein, trotz 15 Minuten langen Kochens in destilliertem Wasser suspendiert, von seiner Löslichkeit in NaOH

nichts einbüßt und daß eine Lösung von neutralem Caseinnatriu caseinat nach gleich langem Erhitzen und nachfolgender Elektrodialy ebenfalls bezüglich seiner Laugenlöslichkeit unverändert geblieben (vgl. Tabelle XXXI). Alkalisalzzusatz bis 0,5 n Endkonzentrati führt keine sichtbare Veränderung herbei, $BaCl_2$ fällt schon in d Kälte (vgl. Tabelle XXXII). Caseinchlorid, hergestellt durch Üb neutralisierung von Natriumcaseinat mit HCl[1]), also in Gegenwa kleiner Neutralsalzmengen, ist beim Kochen stabil und wird dur KCl-Zusatz von 0,1 n und 0,01 n K_2SO_4 schon in der Kälte gefäl Trotz der scheinbaren Übereinstimmung im Bindungsmechanism von Säuren[2]) und Laugen[3]) zeigt dennoch Casein gegenüber Hitz einwirkung ein von Globulin gänzlich verschiedenes Verhalten.

Tabelle XXXI.

Casein:	a) in 0,01 n NaOH gelöst	b) In wässeriger Suspension gekocht, in 0,01 n NaOH gelöst	c) a gekocht, e. d. in 0,01 NaOH gelöst
Trockengehalt	1,95 Proz.	1,97 Proz.	1,94 Proz.

Tabelle XXXII.

1 proz. Casein-Endkonzentration in allen Versuchen.
0,005 n NaOH-Endkonzentration in allen Versuchen.

Salzendkonzentration		0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,05 n	0,1 n	0,5 n
KCl	a	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	p	θ	θ	θ	θ	θ	θ
KNO_3	a					θ	θ
	p					θ	θ
$BaCl_2$	a	×			×		
	p	×			×		

Ebenso läßt auch bekanntlich Gelatine bei Hitzeeinwirkung (unte Vermeidung eines Abbaues) eine Veränderung im Sinne einer Löslichkeits verminderung vermissen, während sein Säure- und Laugenbindungs vermögen[4]) sich von demjenigen des Albumins nur quantitativ unter scheidet. Es scheinen diese Tatsachen sogar in gewissem Widerspruc zu stehen zu den bezüglich der Hitzeveränderung von Globulin unc

[1]) Vgl. *T. B. Robertson*, Physikalische Chemie der Proteine. Dresden Steinkopff, 1912.
[2]) Eigene unveröffentlichte Befunde.
[3]) *Wo. Pauli* und *J. Matula*, diese Zeitschr. 99, 219, 1919; *M. Adolf*, l. c
[4]) Vgl. *Wo. Pauli*, Kolloidchemie der Eiweißkörper, l. c.

bumin gemachten Annahmen über die chemischen Grundlagen dieses Prozesses. Denn wir lernen hier Eiweißkörper kennen, bei denen auf Grund eines ähnlichen physikalisch-chemischen Verhaltens auch auf einen ähnlichen chemischen Aufbau geschlossen werden muß und bei denen aber nachweisbare Veränderungen beim Erhitzen ausbleiben. Dabei muß aber auch berücksichtigt werden, daß nach den Ansichten von *Greenberg* und *Schmidt*[1]) als Laugenbindungsstellen von Proteinen die freien Carboxylgruppen von Glutamin-, Asparagin-, β-Hydroxoglutaminsäure und die Hydroxylgruppe des Tyrosins in Betracht kommt und unsere Kenntnis über den Aminosäuregehalt der einzelnen Eiweißkörper recht mangelhaft ist. Ferner geht aus den neuesten Zusammenstellungen von *Hoffmann* und *Gortner*[2]) hervor, daß kein Zusammenhang besteht zwischen der bei einer bestimmten p_H gebundenen Laugenmenge und dem Gehalt an zweiwertigen Aminosäuren. Es scheint daher auch nicht möglich zu sein, das Verhältnis der endständigen Säure- und Laugenbindungsstellen, die etwa unter Ringschluß miteinander reagieren können, bei den einzelnen Proteinen festzustellen. Somit lassen sich die durch die Hitzeeinwirkung am Globulin und Seralbumin hervorgebrachten Veränderungen allerdings durch die Annahme eines Ringschlusses der endständigen Gruppen dem Verständnisse näherbringen, ohne daß deswegen andere durch eine differente Methodik nachweisbare Modifikationen auszuschließen sind. Jedoch vermag diese Deutung der stattgehabten Hitzeveränderung nicht zu erklären, warum die letztere bei einzelnen Proteinen vermißt wird. Ferneren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, festzustellen, ob die besondere chemische Konstitution solcher nicht hitzeveränderlicher Eiweißkörper Anhaltspunkte bietet für die Annahme, daß ein Ringschluß endständiger Gruppen beim Erhitzen ausbleibt oder in verringertem Maße stattfindet.

Zusammenfassung.

1. Gegenstand der vorliegenden Untersuchung bildet das Verhalten von Ser- und Ovalbumin im reinsten Zustande und mit wechselnden Säure- und Laugenzusätzen beim Erhitztwerden, die Beeinflussung dieser Reaktion durch Neutralsalzzusatz, die Eigenschaften der so entstandenen Produkte bezüglich ihrer Wasserlöslichkeit und ihrer Reaktionen mit Laugen, Säuren und Neutralsalzen.

---

[1]) *D. M. Greenberg* und *C. S. A. Schmidt*, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 21. 281, 1924.

[2]) *W. F. Hoffmann* und *R. A. Gortner*, Kolloid Symposium. Monographie. 1925.

2. Durch Elektrodialyse dargestelltes und gereinigtes Albun von einem Aschengehalt von weniger als 0,04 Proz. koaguliert be Sieden vollständig, desgleichen ein entsprechend gereinigtes Ovalbumi In beiden Fällen erscheint gegenüber den ursprünglichen Lösung die C_H vermindert und die Leitfähigkeit erhöht zu sein.

3. Das so entstandene Produkt von Seralbumin, in Lau gelöst, zeigt je nach dem beobachteten Verhältnis Protein: Lauge al Übergänge von der vollständig wasserlöslichen, bei elektrodialytisch Entfernung des Elektrolyten lösungsstabilen Form über Gemenge v wasserlöslichem und -unlöslichem Protein bis zum totalen Überwieg des letzteren.

4. Es konnte gezeigt werden, daß, solange beim Lösen von hitz koaguliertem Albumin in Lauge wasserlösliches Protein neben -u löslichem entsteht, das letztere in Neutralsalzen löslich ist.

5. Das bei Elektrodialyse der im Überschuß des hitzegefällte Albumins in NaOH hergestellten Lösung entstandene wasserlösliche Protein (Protein X) zeigt die gleiche Leitfähigkeit, C_H und optisch Drehung wie das genuine Seralbumin. Das Protein X koagulier beim Erhitzen, seine Gerinnungstemperatur stimmt bei gleicher Kon zentration mit derjenigen seines Ausgangsmaterials überein, mi welchem ihm auch das Verhalten bei Salzzusätzen gemein ist. Hingege vermochte die Prüfung mittels Goldsol- und Mastixsolreaktion und Alkoholfällung bei qualitativer Übereinstimmung des Verhalten quantitative Unterschiede festzustellen.

6. Nachdem gezeigt werden konnte, daß elektrodialysiertes, au Pferdeserum dargestelltes Albumin mit Pferdeserumpräzipitin noc bei Verdünnung von 1 : 100000 eine deutliche Reaktion gibt, wurd der Nachweis erbracht, daß hitzekoaguliertes Albumin, das nac NaOH-Behandlung seine volle Wasserlöslichkeit wieder erlangt hatte im Präzipitationsversuch sich qualitativ und quantitativ verhielt wi genuines Albumin. Ähnlich verhält sich das nach Behandlung de hitzekoagulierten Albumins mit Salzsäure entstandene wasserlöslich Eiweiß, während das zur Verhinderung der Koagulation in NaOH Gegenwart erhitzte Albumin ebenso wie Koktoserum seine Reaktions fähigkeit mit dem Präzipitin nahezu eingebüßt hatte.

7. Präzipitierendes Serum, welches durch Vorbehandlung vo Kaninchen mit dem Protein X erhalten wurde, präzipitiert dieses ebenso genuines Albumin und genuines Serum, nicht aber Koktoserum Ebenso geben Mischungen des Proteins X mit Albumin, nicht abe solche des ersteren und des letzteren mit Koktoserum die Präzipitin reaktion.

8. Präzipitierendes Serum, welches durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Koktoserum erhalten wurde, gab Fällung mit diesem letzteren, nicht aber mit dem Protein X, noch mit genuinem Albumin.

9. Hitzegefälltes Eialbumin löst sich in NaOH zu einer trüben Flüssigkeit und fällt aus derselben bei Neutralisation oder Elektrodialyse wieder aus. Bei Neutralisation in Salzgegenwart bleibt die Lösung stabil, der Eiweißkomplex erweist sich beim Wanderungsversuch im elektrischen Strom als positiv geladen und wird aus der Lösung durch Verdünnung mit Wasser unter Vermehrung der potentiometrisch gemessenen H-Ionen, Ansäuerung und durch Eindrittel- bis Halbsättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt.

10. Erhitzt man Seralbumin in Gegenwart von steigenden Mengen HCl und unterwirft die klaren Lösungen hierauf der Elektrodialyse, so zeigt sich, daß bei einem bestimmten Albuminsäureverhältnis etwa 90 Proz. der ursprünglichen Proteinmenge wasserunlöslich geblieben ist. Bei höherer Säurekonzentration nimmt der wasserunlösliche Teil, der jedoch gegenüber Neutralsalzen seine Löslichkeit bewahrt, auf Kosten des wasserlöslichen Teiles zu.

11. Wird jedoch Seralbumin mit steigendem Laugenzusatz erhitzt, so ist nur eine schmale Zone innerhalb des Albumin-Laugenverhältnisses nachweisbar, innerhalb welcher ein Teil des Albumins nach Elektrodialyse sich als wasserlöslich erweist. Bereits in Laugenkonzentrationen, die vom Albumin noch vollständig gebunden werden, findet beim Erhitzen ein bei nachheriger Elektrodialyse nachweisbares vollständiges Unlöslichwerden des Proteins statt. Es wird gezeigt, daß das so erzielte Produkt von demjenigen, welches unter quantitativ vergleichbaren Verhältnissen bei Behandlung von hitzekoaguliertem Albumin mit Lauge entsteht, sich durch seine Löslichkeitsverhältnisse weitgehend unterscheidet.

12. Aus Serumalbumin hergestelltes Acidalbumin erweist sich lösungsstabil bei Neutralisation in Salzgegenwart. Alkalialbumin hingegen kann wohl nur bei Neutralisation lösungsbeständig sein und wird durch relativ geringe Salzmengen gefällt.

13. Eialbumin mit steigenden Mengen Säure oder Lauge erhitzt, führt in allen untersuchten Fällen zur Entstehung wasserunlöslicher Produkte, die sich nach Neutralisation auch als salzunlöslich erweisen.

14. Neutralsalze zu Säure- oder Laugenseralbuminlösungen zugefügt, wirken nur fällend, falls der Zusatz vor dem Erhitztwerden erfolgt, unabhängig von dem Verhältnis des wasserlöslichen und -unlöslichen Eiweißes in der Lösung.

15. Lösungen von Eialbumin mit Laugenzusätzen verhalten si
bezüglich ihrer Reaktion zu Neutralsalzen beim Erhitzen wie die en
sprechenden Seralbumine, hingegen ist beim Säureovalbumin d
vom Zeitpunkt des Neutralsalzzusatzes abhängige Unterschied i
Verhalten beim Erhitzen nur ein quantitativer.

16. Casein in Wasser suspendiert oder in einer Lösung sein
neutralen Alkaliverbindung zum Sieden erhitzt, zeigt bei nachträglich
Elektrodialyse keine Veränderung seiner Laugenlöslichkeit. Alka
chloridzusatz auch vor dem Erhitzen zugesetzt, vermag eine Alka
caseinlösung nicht zur Fällung zu bringen.

Eine klinische Methode zur quantitativen Bestimmung von Salicylsäure in Blutserum und Liquor cerebrospinalis.

Von

Karl Loberg.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 21. Januar 1926.)

Auf Anregung meines Klinikchefs, Prof. *V. Wigert*, führte ich im September 1925 einige Untersuchungen über die Permeabilitätsquote für Brom (nach *Hauptmann*) an mehreren Geisteskranken aus. Da es mich interessierte, dieses Verhältnis auch hinsichtlich anderer Stoffe zu prüfen, die in genügend großen Dosen verabreicht werden können, um eine quantitative Bestimmung in Serum und Liquor zu ermöglichen, gab ich einem Patienten (Dem. praecox) probeweise täglich während 5 Tagen 6 g Natrium salicylic. (= ungefähr *Hauptmanns* Bromdosen) und lumbalpunktierte am sechsten Morgen. Bei der Untersuchung der Lumbalflüssigkeit, wobei ich auf die gleiche Weise vorging, wie bei der Methode von *Hauptmann* zur Brombestimmung, zeigte es sich, daß sie mit Eisenchlorid eine deutliche Salicylsäurereaktion gab. Nach der mir zugänglichen Literatur haben bisherige Untersucher im Liquor beim Menschen Salicylsäure überhaupt nicht nachweisen können (*Vidal*, *Sicard*, *Rotky*, *Castaigne*, *Redlich*, *Pötzl* und *Hess* u. a. m.). Worauf dies beruht, läßt sich nicht leicht sagen. Vielleicht ist die Ursache die, daß das Mittel in zu kleinen Dosen und während zu kurzer Zeit verabreicht worden ist. Nach der Einnahme von Natrium salicyl. per os hört die Ausscheidung mit dem Harne nach etwa 48 Stunden auf (nach *Hanzlik*) und von der zugeführten Menge werden nur ungefähr 80 Proz. wiedergefunden. Der Rest sollte nach dem gleichen Verfasser im Organismus zerstört werden. Dies ist indessen, soweit ich finden kann, nur eine Annahme, und es ist wohl auch denkbar, daß die übrigen 20 Proz. auf die eine oder andere Weise im Organismus zurückgehalten werden, und daß bei einer länger andauernden Verabreichung des Mittels eine Anhäufung möglich ist. Sei dem nun wie immer. Kurz, die Salicylsäure geht auch beim Menschen, bei hinreichend großen Dosen und während genügend langer Zeit vor der Punktion verabreicht,

in den Liquor über, was ich bei einigen weiteren Geisteskranken h
feststellen können. (Diese Untersuchungen werden fortgesetzt
später Gegenstand einer Veröffentlichung werden.) Sie erscheint
auch in genügender Menge, um quantitativ bestimmt werden zu könn
Zu diesem Zwecke zeigte sich indessen die Brombestimmungsmeth
von *Hauptmann* unverwendbar, vor allem deshalb, weil die Sali
säure vom Koagulum in zu großer Ausdehnung gebunden wird.
den bisher publizierten quantitativen Methoden zur Bestimmung
Salicylsäure im Serum schien keine für den klinischen Gebrauch ric
geeignet zu sein, besonders wegen der umfangreichen Laboratoriu
ausrüstung, die hierzu erforderlich ist. Außerdem dürfte sich ke
mit Vorteil zur Bestimmung von Salicylsäure im Liquor verwen
lassen.

Ich bin deshalb mit Dankbarkeit auf den Vorschlag von P
Widmark eingegangen, in seinem Institut und unter seiner Leit
eine neue und für die in Frage stehenden Untersuchungen geeign
Methode auszuarbeiten. Ich erlaube mir daher, hier für die von i
erhaltenen Ratschläge und Hilfe während der Ausarbeitung der Metho
meinen tiefempfundenen Dank auszusprechen. Gleichzeitig möc
ich auch meinem Klinikchef, Prof. *Wigert*, für Rat und Beistand,
mir im Verlauf der Arbeit von seiner Seite zuteil wurden, mein
Dank aussprechen.

Geschichtliches.

Die frühesten Versuche, Salicylsäure in Körperflüssigkeiten quantitat
zu bestimmen, dürften dem Harn gegolten haben. Das Präparat wur
1874 in die Therapie eingeführt, und 1875 veröffentlichten *Feser* und *Fri*
berger eine Ätherextraktionsmethode. Das Prinzip derselben ist Ansäueru
mit verdünnter Salzsäure und Extraktion mit Äther. *Hanzlik*[1]) und M
arbeiter, die sich während der letzteren Jahre eigehend mit Salicylsäu
bestimmungen beschäftigten, verwerfen indessen die Methode wegen ihr
Unsicherheit.

1890 machte *Mosso* auf den Umstand aufmerksam, daß die Unte
sucher bis dahin den Teil der Salicylsäure übersehen haben, der in d
Form von Salicylursäure ausgeschieden wird. Er gab auch eine eige
Methode zur Bestimmung der Salicylsäure im Harn an. Diese besteht in d
Fällung des Harns mit neutralem Bleiacetat, Zusatz von Ammoniak un
Bleiacetat zum Filtrat sowie Erwärmen. Der hierbei entstandene Niede
schlag wird mit Ammoniumcarbonat zerlegt und abfiltriert. Das Filtr
wird mit einer Mischung von Äther und Essigsäureäthylester extrahier
Der Äther wird verdunsten gelassen und der Rückstand gewogen. *Hanzl*
und *Thoburn* haben die Methode überprüft und sie mit sehr groben Fehler
behaftet gefunden.

Die Methode von *Sauerland*, die auch von den eben genannten Ve
fassern geprüft und ziemlich unsicher befunden worden ist, besteht i

[1]) Hinsichtlich der früheren Historik folge ich in der Hauptsach
Hanzlik und *Thoburn* (The journal of biol. chem. **23**, 1915).

einern des Harns, Sättigung mit Ammoniumsulfat und Extraktion mit einer Mischung von 3 Teilen Petroläther und 2 Teilen Chloroform. Der Extrakt wird mit Eisenalaun versetzt, worauf die violette Lösung durch Vergleich mit einem Natriumsalicylatstandard beurteilt wird. *Devrient*, der später (1922) mit dieser Methode gearbeitet hat, erachtet sie als zulässig. Er fand, daß von per os verabreichtem Natriumsalicylat höchstens ... Proz. mit dem Harn ausgeschieden werden, während *Hanzlik* mit seiner Methode, worüber unten mehr, 79,9 Proz. wiedergefunden hat.

Hanzlik und *Thoburn*, die ihre Methode zur Bestimmung von Salicylsäure in Harn, Blut und Fäzes 1915 veröffentlichten, machen geltend, daß quantitative Bestimmungen sich auf der Darstellung der Säure in reiner ... oder wässeriger Lösung ohne störende Beimengungen gründen ... Das Prinzip für ihre Methode ist folgendes: 1. Hydrolyse der betreffenden Flüssigkeit, 2. Destillation und 3. kolorimetrische Bestimmung des Destillats. Die Hydrolyse bezweckt, die der Ätherextraktion unzugängliche Salicylursäure in Salicylsäure überzuführen. Als hydrolysierendes Mittel hat sich Phosphorsäure als vorteilhaft erwiesen, da sie nicht gleichzeitig die Salicylsäure zerlegt. Hydrolyse und Destillation können gleichzeitig ausgeführt werden. Bei der kolorimetrischen Bestimmung werden ... der 10 ccm des Destillats, das mit einer bestimmten Menge Eisenalaunlösung versetzt und in einem Nesslerrohr auf 50 ccm verdünnt worden ist, mit einem bestimmten Quantum auf das gleiche Volumen verdünnter Standardlösung verglichen. Die erste Ablesung ist präliminar. Dann werden zwei definitive Bestimmungen ausgeführt. Die Verfasser geben an, daß sie mit dieser Methode zwischen 5 und 0,02 mg liegende Mengen bestimmen können.

Der erste, der eine quantitative Bestimmung von Salicylsäure im Serum versucht zu haben scheint, ist *Levin* (1913). Seine Methode besteht in einer Extraktion des Serums mit Äther nach Zusatz von Schwefelsäure sowie Ablesung im Kolorimeter von *Authenrieth*.

2 Jahre später kam die oben skizzierte Methode von *Hanzlik* und Thoburn, die auch für Blut verwendet worden ist. Der Gang derselben ist folgender: 15 ccm Blut werden mit 98 proz. Alkohol auf 150 ccm verdünnt, kräftig geschüttelt und 1 Stunde stehengelassen, worauf die Mischung filtriert wird. 100 ccm des Filtrats werden mit 5 bis 6 Tropfen gesättigter Zinkchloridlösung versetzt, um restierendes Eiweiß zu fällen. Das Gefäß wird dann im elektrischen Ofen bis zur fast vollständigen Verdunstung des Alkohols stehengelassen, worauf man 25 ccm Aqua dest. zusetzt, den Inhalt auf ein Drittel des Volumens konzentriert und, wenn nötig, mehrmals filtriert sowie das Filter drei- bis viermal mit heißem Wasser wäscht. Das Filtrat wird nun mit wenig Wasser sowie 20 ccm 85 proz. Phosphorsäure versetzt, worauf man destilliert, bis alle Salicylsäure übergegangen ist. Das Destillat wird auf ein bestimmtes Volumen verdünnt und auf die oben beschriebene Weise kolorimetrisch bestimmt.

Mit der Methode, die an Ochsen- und Hundeblut geprüft wurde, konnten bei Quantitäten von 5 und 6 mg 93 bzw. 95 Proz. wiedergefunden werden; bei 7,5 und 10 mg 95 Proz. Die Verfasser fanden auch, daß Venenblut von Patienten, die volle medizinische Dosen von Natrium salicyl. genommen hatten, in 10 ccm 3 bis 6 mg (= 0,3 bis 0,6 Prom.) Salicylsäure enthielt. Diese Werte stimmen mit den von mir bisher gefundenen überein (0,354 bis 0,545 Prom.). Die Dosen sind hierbei etwas größer gewesen als bei dem in der Einleitung erwähnten Falle, nämlich dreimal 2 g während

3 Tagen, viermal 2 g an 2 Tagen und zweimal 2 g am sechsten Tage bzw. und 1 Stunde vor der Lumbalpunktion.

1917 veröffentlichte *Friderichsen* eine auf dem Prinzip von *B* Mikroanalyse aufgebaute quantitative Methode zur Bestimmung Salicylsäure im Blute. Nach dieser verfährt man so, daß eine geeig Menge Blut von einem hierzu besonders zubereiteten Löschpapier gesogen und gewogen wird. Das Papier wird in ein Reagenzrohr g und 10 ccm kochende Chlorkaliumlösung (die pro Liter 1,5 ccm 25 HCl enthält) zugesetzt, worauf das Rohr 3 Stunden stehengelassen Die Chlorkaliumlösung wird dann in einem Scheidetrichter viermal Äther ausgeschüttelt. Der salicylsäurehaltige Ätherextrakt wird in ei Erlenmeyerkolben am Wasserbad bei einer Temperatur eingedunstet, 1 bis 2° niedriger ist als der Kochpunkt des Äthers. In dem Augenb wo der Äther verdunstet ist, wird der Kolben vom Wasserbad entfernt die letzten Äthertropfen mittels Durchleiten eines Luftstromes entf Darauf wird die Salicylsäure in Wasser gelöst und in einem Meßko verdünnt. Bei der kolorimetrischen Bestimmung wird zuerst orientierende und dann eine endgültige Ablesung vorgenommen. Bei endgültigen wird eine bestimmte Menge der Probelösung, die mit e bestimmten Anzahl Tropfen einer 1proz. Eisenalaunlösung versetzt wu mit sieben Standardrohren steigender Konzentration und mit einer Diffe von 0,005 mg Natriumsalicylat verglichen. Die Konzentration des mittl Rohres wird durch die orientierende Ablesung bestimmt. Nach Kontrollproben von *Friderichsen* wurden die Bestimmungen mit e Sicherheit von 0,01 bis 0,02 mg ausgeführt. Sämtliche erhaltenen W waren niedriger als die berechneten. Die verwendeten Blutmengen betr 200 bis 600 mg.

Die neueste Methode zur quantitativen Bestimmung von Salicyls in Körperflüssigkeiten ist von *Hérissey* (1922) angegeben. Bei der wendung derselben für Blut werden 10 ccm Serum, 5 ccm H_2O, 5 20proz. H_2SO_4 und 40 ccm offizineller Äther in einen 125-ccm-Kol gebracht und dieser mit einem Pfropfen versehen. Der Kolben wird unge 1 Minute kräftig geschüttelt und dann einige Augenblicke stehengelas Darauf werden weitere 4,5 ccm 20proz. H_2SO_4 zugesetzt und der Ko einige Male vorsichtig auf den Kopf gestellt. Nach ungefähr 5 Minu hat sich der Niederschlag als relativ festes Gelee abgesetzt und der Ät extrakt kann dekantiert werden. 30 ccm desselben werden nun mit 2 bis wasserfreiem Natriumsulfat geschüttelt, von dem dann abfiltriert w Das Filtrat wird nun mit 3 ccm Wasser und 1 Tropfen 1proz. Eisenchlo lösung versetzt (= 1 ccm offizineller Eisenchloridlösung auf 10 ccm dünnt), wonach die Mischung geschüttelt wird. Bei Anwesenheit Salicylsäure entsteht Violettfärbung. Der Extrakt wird darauf in Kristallisationsschale überführt und der Äther bei Zimmertempera verdunsten gelassen. Der Rückstand wird abfiltriert und das Filtrat 3 ccm verdünnt, worauf man gegen eine auf die gleiche Weise zubereit Farbenskala abliest. Der Verfasser gibt an, daß er mit dieser Meth Salicylsäure in einer Konzentration von 0,010 Prom. bestimmen k und daß sie sich auch für andere Körperflüssigkeiten, wie Harn und Liq cerebrospinalis, verwenden läßt.

Fissinger und *Debray*, die mit der Methode gearbeitet haben, fand daß das Serum nach einer Dosis von 1 g Natrium salicyl. in 100 g Was per os nach 10 Minuten Salicylsäurereaktion gibt und seine maxim

entration (0,1 Prom.) zwischen 1 und 1½ Stunden nach der Einnahme reicht.

Ich habe diese Methode selbst zu verwenden versucht, sie ist mir jedoch ittlich wegen der Schwierigkeit, die Fällung zum Absetzen zu bringen, ihlungen.

Eigene Methodik.

Beim Ausexperimentieren der Methodik bin ich von der Brom-stimmungsmethode von *Hauptmann* ausgegangen, die sich zum litativen Nachweis von Salicylsäure in Serum und Liquor ver-ndbar erwiesen hat. Hierbei fällte ich also ein mit zwei Teilen Wasser dünntes Serum bzw. Liquor mit 20 proz. Trichloressigsäure und setzte das Filtrat mit Eisenchlorid, wobei eine deutlich violette bung auftrat. Als ich diese Methode für quantitative Bestimmungen verwenden versuchte, erwies sie sich jedoch als unverwendbar, und hauptsächlich aus zwei Gründen. Teils wird eine bedeutende Menge in vitro zugesetzten Salicylsäure bei der Eiweißfällung gebunden teils tritt beim Zusatz von Eisenchloridlösung zum Filtrat eine ngegelbe Farbenkomponente auf, die die kolorimetrische Be-mmung erschwert. Um die erste Schwierigkeit zu umgehen, wurden erst andere Fällungsmittel versucht. So wurde Natriumwolframat Schwefelsäure nach *Folin*, sowie Uranacetat geprüft, jedoch mit gativem Resultat. Ferner versuchte ich mit Äther und Chloroform extrahieren, jedoch mit ebensowenig Erfolg. Ich benutzte daher iederum 20 proz. Trichloressigsäure und versetzte auf den Vorschlag von Prof. *Widmark* mit 92proz. Alkohol, um die Bindung von Salicyl-säure bei der Eiweißfällung zu verhindern. Dies ergab bei wiederholten Kontrollversuchen ziemlich günstige Resultate. Bei Prüfung mit variierten Mengen Alkohol im Verhältnis zur Trichloressigsäure zeigte es sich, daß die optimale Relation doppelt soviel Alkohol als Trichloressigäure beträgt. Bei größeren Alkoholmengen wird die Fällung unvollständig und eine kolorimetrische Bestimmung aus diesem Anlaß unmöglich. Schon bevor wir mit der eben erwähnten Schwierig-keit ins reine gekommen sind, was sozusagen den Schlußstein der Experimente bildete, war die andere wenigstens präliminar beseitigt. Die orangegelbe Komponente trat bei sämtlichen Fällungs- und Extraktionsversuchen im Filtrat nach Zusatz von Eisenchlorid auf (auch bei Blindtitration ohne Salicylsäure im Serum). Da diese Komponente, die sowohl im Serum- wie Liquorfiltrat regelmäßig auftrat, möglicherweise auf der Anwesenheit von Milchsäure beruhen konnte, wurden Versuche mit Zusatz von Calciumlactat zur Standard-lösung vorgenommen. Die hierbei bei Gegenwart von Eisenchlorid auftretende Gelbfärbung ist jedoch blaßgelb. Versuche mit drei ver-schiedenen Sorten von Tropaeolin als kompensierenden Farbenzusatz

fielen auch ungünstig aus. Schließlich fanden wir im Vesuvin (Bismarc braun) einen Farbstoff, der bei Zusatz einer geeigneten Menge zu Standard den störenden orangegelben Farbeneinschlag im Serum- u Liquorfiltrat vollständig kompensiert. Bei den Experimenten in vit mit Pferdeserum variierten die hierfür erforderlichen Mengen zwische 0,05 und 0,15 ccm einer 0,2prom. wässerigen Lösung. Bei Versuche in vivo habe ich immer 0,05 ccm, sowohl bei Serum- wie Liquo bestimmungen, zugesetzt.

Eine andere wichtige Einzelheit der Methode ist, daß die Prob und Standardlösungen durch Neutralisation mit normaler Natronlaug und nachherigem schwachen Ansäuern mit der gleichen Menge 2pro Trichloressigsäure (1 ccm zu 6 ccm Standardlösung) auf die gleich Wasserstoffionenkonzentration gebracht werden. In stark saure Lösung wird nämlich die violette Farbe schwächer, und dies würd bei den geringen, hier in Frage stehenden Salicylsäurequantitäten di Bestimmung im Kolorimeter erschweren oder unmöglich machen. E hat sich nämlich bei den Experimenten herausgestellt, daß bei den von mir benutzten Kolorimeter (*Klett*) die totale Menge Salicylsäur nicht weniger als 0,5 mg in 8 bis 11 ccm definitiver Lösungsmeng betragen soll[1]). Mit neutraler Lösung zu arbeiten ist andererseit unmöglich, weil hierbei Eisenoxydhydrat in zu großer Menge auftritt und die Bestimmung unmöglich macht.

Es ist auch erforderlich, mit konstanter Eisenchloridmenge zu arbeiten, was aus untenstehender Tabelle hervorgeht, wo die Proben 2 3 und 4 gegen 1 als Standard mit 20 mm Flüssigkeitshöhe abgelesen wurden.

Nr.		Kolorimeterwert
1	0,5 ccm Salicylsäure 1 prom. + 0,05 ccm $FeCl_3$ 5 proz. + 7,5 H_2O	20,0
2	0,5 „ „ 1 „ + 0,10 „ „ 5 „ + 7,45 „	17,4
3	0,5 „ „ 1 „ + 0,15 „ „ 5 „ + 7,40 „	17,0
4	0,5 „ „ 1 „ + 0,20 „ „ 5 „ + 7,35 „	17,3 (gelber)

Nach dem Standardisieren der Methode und bei den schließlichen Kontrollproben habe ich 0,30 ccm Eisenchloridlösung benutzt, um bei

[1]) Als Beweis hierfür können folgende Versuche dienen:

	Berechnete Konzentration Prom.	Gefundene Konzentration Prom.	Fehler Proz.
6 ccm Liquor + 0,15 mg Salicylsäure	0,025	0,018	24
6 „ „ + 0,15 „ „	0,025	0,017	32

Der Standard, gegen den die Proben abgelesen wurden, enthielt 0,2 mg Salicylsäure.

ventuell höherem Salicylsäuregehalt der Probelösung sicher zu sein, daß sie immer im Überschuß vorhanden ist. Die Salicylsäuremenge in der Standardlösung (= 0,5 mg) ist nämlich geringer als die Menge, die in 5 ccm dreimal verdünntem Serum, nach oben genannten per os genommenen Mengen von Natrium salicylic., wiedergefunden wird.

Die im Liquor auftretende Salicylsäuremenge, die bei den bisher geführten Untersuchungen zwischen 0,004 Prom. und 0,045 Prom. riiert hat, ist viel zu gering, um eine kolorimetrische Bestimmung d oben beschriebene Weise zu ermöglichen. Orientierende Experimente t reinen Salicylsäurelösungen zeigten indessen, daß man eine für e Empfindlichkeit des Kolorimeters zu schwache Lösung gegen einen reichend starken Standard ablesen kann, indem man zu der wächeren Lösung eine bekannte Menge Salicylsäure zusetzt (und m Standard eine entsprechende Menge Wasser), worauf man bei der rechnung mit der zugesetzten Menge nach folgender Formel reduziert, enn der Standard auf 20 mm eingestellt ist: $X = \frac{20 \cdot S}{K} - \frac{D}{V}$;

S = die Konzentration der Standardlösung in Promillen,
K = der abgelesene Kolorimeterwert in Millimetern,
V = das Volumen der Standardlösung bzw. der Probelösung in Kubikzentimetern,
D = die zugesetzte Menge Salicylsäure in Milligrammen,
X = die Konzentration der Probelösung in Promillen.

Hinsichtlich des Standards scheint es a priori von Bedeutung zu sein, daß er eine so weit als möglich mit der Probelösung übereinstimmende Salzkonzentration erhält. Zu diesem Zwecke wurde die Menge Trichloressigsäure austitriert, die bei der Fällung gebunden wird; sie betrug für Serum ungefährt 20 Proz. Dies haben sowohl die ausgeführten Kontrollproben in vitro wie die bisher vorgenommenen Untersuchungen in vivo bestätigt. Wenn ich also bei der Herstellung des Standards 80 Proz. der bei der Fällung verwendeten Trichloressigsäuremenge zugesetzt habe, sind die Mengen n Natronlauge, die zur Neutralisation der Probe- und Standardlösungen erforderlich waren, immer annähernd gleich gewesen (höchste Differenz 0,05 ccm). Der Eiweißgehalt im Liquor ist dagegen so unbedeutend, daß er keine meßbare Menge Trichloressigsäure bindet. Ich will hier die Bedeutung hervorheben, daß die genannte Neutralisation äußerst genau vorgenommen wird, denn bei dem geringen Säuregrad, den die definitiven Lösungen durch Zusatz von 1 ccm 2proz. Trichloressigsäure erhalten, kann ein einziger Tropfen Natronlauge zuviel die Ablesung vereiteln. Die Lösung wird hierbei nämlich fast neutral und die durch das Eisenoxydhydrat verursachte gelbe Farbe macht sich sofort stark geltend.

In bezug auf die Ablesung im Kolorimeter, das genau für d
Ableser eingestellt sein muß, sind für jede Bestimmung fünf Ablesung
auf die Weise gemacht worden, daß ich mich dem Farbengleichhei
punkt abwechselnd von oben und von unten näherte.

Die Ausführung der Bestimmungen in ihren Einzelheiten.

Erforderliche Geräte:

1. Eine Zentrifuge.
2. Reagenzröhren, Trichter, Bechergläser und Filtriergestell.
3. Büretten.
4. Pipetten, in $^1/_{10}$ und $^1/_{100}$ ccm geteilt (mindestens zwei letzte Art).
5. Ein Kolorimeter.

Erforderliche Lösungen:

1. Trichloressigsäure, 20proz.
2. „ 2proz.
3. Alkohol, 92proz.
4. $FeCl_3$-Lösung, 5proz.
5. Salicylsäurelösung, 0,2prom. (Standard).
6. n Natronlauge.
7. Phenolphthalein, 0,5proz.
8. Vesuvinlösung, 0,2prom.

Bestimmung der Salicylsäurekonzentration im Serum.

Bei der Venenpunktion wird das Blut direkt in Zentrifugenröhre
(zwei oder vier) von 12 ccm Volumen abgezapft. Wenn das Blu
koaguliert ist, wird das Koagulum von den Wänden des Rohres mi
einem reinen Glasstab losgelöst, worauf zentrifugiert wird, bis ma
in jedem Rohre eine klare etwa 3 cm hohe Serumschicht erhalten ha

In ein Reagenzrohr von 25 bis 30 ccm Volumen werden 5 cc
Serum, 4 ccm destilliertes Wasser und 6 ccm 92proz. Alkohol gebracht
Hierbei wird eine mäßige Menge Eiweiß niedergeschlagen. Der Inhalt de
Reagenzrohres wird nun in ein anderes, gleiches, umgegossen und darau
wieder zurück, bis die Mischung homogen geworden ist. Dann werde
3 ccm 20proz. Trichloressigsäure zugesetzt und auf die eben beschrieben
Weise gemischt, bis die Fällung homogen geworden ist, worauf ma
das Reagenzrohr zukorkt und wenigstens 1½ Stunden beiseite stell
Nach dieser Zeit hat sich im Rohre am Boden oder weiter oben ge
wöhnlich eine klare Flüssigkeitsschicht angesammelt. Der Nieder
schlag wird filtriert, wenn nötig zweimal. Das Filtrat muß vollständi
wasserklar sein. Um dies zu erreichen, ist es wichtig, sich eines gute
Filtrierpapiers zu bedienen (ich verwende Munktells, Grycksbo, Nr. OB
9 cm Diam.). Vom Filtrat werden nun 6 ccm (= ein Drittel der ursprüng
lichen Menge der Mischung) in ein Reagenzrohr gebracht und mi
normaler Natronlauge und Phenolphthalein (1 Tropfen einer 0,5proz

Lösung) als **Indikator** neutralisiert (genau!). Hierauf werden 1 ccm 2proz. Trichloressigsäure und 0,30 ccm 5proz. Eisenchloridlösung versetzt und geschüttelt, bis die violette Färbung homogen geworden ist. Nach etwa 10 Minuten wird im Kolorimeter abgelesen. Während dieser Zeit wird der Standard hergestellt, der folgende Zusammensetzung hat: 0,05 ccm 0,2prom. Vesuvinlösung + 2,5 ccm 0,2prom. Salicylsäurelösung + 2 ccm 92proz. Alkohol + 0,8 ccm 20proz. Trichloressigsäure + 0,65 ccm destilliertes Wasser (= 6 ccm). Diese Standardlösung wird darauf mit normaler Natronlauge neutralisiert und mit 1 ccm 2proz. Trichloressigsäure auf die gleiche Weise wie das Filtrat angesäuert, sowie mit 0,30 ccm 5proz. Eisenchloridlösung versetzt und bis zur Homogenität der Farbe gemischt. Sollte die zur Neutralisation erforderliche Menge Natronlauge für die beiden Lösungen nicht genau gleich groß sein, so wird mit entsprechenden Mengen Wasser auf gleiches Volumen gebracht. Ablesung im Kolorimeter, wobei die Standardlösung auf 20 mm eingestellt wird.

Aus dem bei der Ablesung erhaltenen Werte (K) wird dann die Salicylsäurekonzentration des Serums nach der Formel $\frac{X}{3 \cdot 0{,}1} = \frac{20}{K}$ berechnet. Die Konzentration des Standards, berechnet auf 5 ccm (= ein Drittel der mit Wasser + Alkohol auf 15 ccm verdünnten Serummenge), wird nämlich im gegebenen Falle 0,1prom., welche Zahl mit 3 multipliziert werden muß, wenn X die Konzentration im unverdünnten Serum darstellen soll[1]).

Beispiel (aus einem meiner Laboratoriumsprotokolle bei Versuchen mit Natrium salicyl. in vivo):

5 ccm Serum + 4 ccm H_2O + 6 ccm 92proz. Alkohol + 3 ccm 20proz. Trichloressigsäure, 11 Uhr 40 Minuten vormittags; filtriert 2 Uhr nachmittags.

Probe		Standard
6,00 ccm Filtrat . . .	wird gegen	0,05 ccm 0,2 prom. Vesuvinlösung
1,20 „ n NaOH . .	neben-	2,50 „ 0,2 „ Salicylsäurelösung
1,00 „ 2proz. Trichloressigsäure	stehenden,	2,00 „ 92 proz. Alkohol
0,30 „ 5proz. $FeCl_3$-lösung . .	auf 20 mm	0,80 „ 20 „ Trichloressigsäure
	eingestellten	0,65 „ H_2O
	Standard	1,15 „ n NaOH
	abgelesen	1,00 „ 2 proz. Trichloressigsäure
		0,30 „ 5 „ $FeCl_3$-Lösung
		0,05 „ H_2O

---

[1]) Übersteigt die Konzentration der Probelösung die der Standardlösung bedeutend (z. B. um das Doppelte oder mehr), so wirkt die freie Menge Eisenchlorid in der letzteren störend auf die Ablesung. In einem solchen Falle wird die Bestimmung erst ausgeführt, nachdem man den Standard z. B. mit weiteren 2,5 ccm 0,2prom. Salicylsäurelösung und die Probelösung mit der gleichen Menge Wasser versetzt hat. Die Formel wird dann: $\frac{X}{3 \cdot 0{,}2} = \frac{20}{K}$.

Bei der Ablesung wurden folgende Werte erhalten: 12,5, 12,4, 1
12,3, 12,5.

Das arithmetische Mittel dieser Zahlen ist 12,44.

$$\frac{X}{3 \,.\, 0{,}1} = \frac{20}{12{,}44}; \; X = 0{,}482 \text{ Prom.}$$

Zu den vorläufigen Experimenten wurde Pferdeserum verwen
Dann ging ich jedoch zu menschlichem Serum über und habe bei
schließlichen Kontrollproben ausschließlich solches von gesun
Personen verwendet, die während wenigstens 8 Tagen vor der Ver
punktion keine Salicylsäure in irgend einer Form eingenommen hal
Diese Kontrollproben haben folgende Resultate ergeben:

Nr.		Berechnete Konzentration Prom.	Gefundene Konzentration Prom.	Fe Pr
1	5 ccm Serum + 1,5 mg Salicylsäure	0,300	0,288	4
2	5 „ „ + 1,5 „ „	0,300	0,297	1
3	5 „ „ + 1,5 „ „	0,300	0,291	3
4	5 „ „ + 1,5 „ „	0,300	0,272	9
5	5 „ „ + 1,5 „ „	0,300	0,282	6
6	5 „ „ + 1,5 „ „	0,300	0,282	6

Der Mittelwert dieser Kontrollproben liegt ungefähr um 5 Pı
niedriger als der berechnete Wert. Von in vitro zugesetzter Salicylsä
können also mit dieser Methode 95 Proz. wiedergefunden werden.

Bestimmung der Salicylsäurekonzentration im Liquor.

In ein Reagenzrohr der oben erwähnten Größe werden 6 c
Liquor und 4 ccm 92proz. Alkohol gebracht, wobei eine schwa
Opaleszenz auftritt. Die Mischung wird geschüttelt bis sie homo
ist, worauf 2 ccm 20proz. Trichloressigsäure zugesetzt werden. I
Inhalt des Reagenzrohres wird durch wiederholtes Umgießen in
anderes gründlich gemischt, worauf das Rohr zugekorkt und wenigst
1 ½ Stunden beiseite gestellt wird (am besten 2 bis 3 Stunden). Währe
dieser Zeit hat sich der Niederschlag zusammengeballt, und das Filt
wird nach zweimaligem Passieren des gleichen Filters wasserkl
Dem Filtrat werden 6 ccm entnommen, in ein Reagenzrohr gebrac
mit normaler Natronlauge neutralisiert sowie mit 1 ccm 2proz. T
chloressigsäure auf die bei der Bestimmung im Serum angegebe
Weise angesäuert. Hierauf wird zuerst eine qualitative Probe v
genommen, indem man 0,05 ccm 5proz. Eisenchloridlösung zuse
und umschüttelt. Entsteht hierbei eine Violettfärbung, werden weit
0,25 ccm Eisenchloridlösung sowie 2,50 ccm 0,2prom. Salicylsäu
lösung zugesetzt. Die Mischung wird geschüttelt, bis die Farbe homog

Ablesung im Kolorimeter nach etwa 10 Minuten. Unterdessen wird der Standard hergestellt. Dieser hat folgende Zusammensetzung: 0,05 ccm 0,2 prom. Vesuvinlösung + 2,50 ccm 0,2 prom. Salicylsäurelösung + 2 ccm 92 proz. Alkohol + 1 ccm 20 proz. Trichloressigsäure + 0,45 ccm H_2O (= 6 ccm). Diese Lösung wird dann mit normaler Natronlauge neutralisiert und wie oben mit 1 ccm 2 proz. Trichloressigsäure angesäuert sowie mit 0,30 ccm 5 proz. Eisenchloridlösung und 2,50 ccm H_2O versetzt. Sollte die für die Neutralisation erforderliche Menge Natronlauge für die Probe- und Standardlösung nicht genau gleich gewesen sein, wird zu einem der Rohre eine kompensierende Menge Wasser zugesetzt (vgl. das bei der Ausführung der Bestimmung im Serum angeführte Beispiel!). Das Reagenzrohr wird geschüttelt, bis die Farbe [illegible]mogen ist, worauf die beiden Lösungen im Kolorimeter verglichen werden. Der Standard wird auf 20 mm eingestellt. Aus dem bei der Ablesung erhaltenen Werte (K) wird dann die Salicylsäurekonzentration des Liquors nach der oben angegebenen Formel in Promille berechnet; diese wird im vorliegenden Falle: $X = \frac{20 \cdot 0,5}{3 \cdot K} - \frac{0,5}{3}$.

Die Konzentration des Standards $\left(= \frac{0,5}{3}\right)$ ist hier, wie ersichtlich, auf 3 ccm berechnet, was der in der Probelösung enthaltenen Liquormenge entspricht.

Beispiel (angeführt aus einem meiner Laboratoriumsprotokolle bei Versuchen in vivo):

6 ccm Liquor + 4 ccm 92 proz. Alkohol + 2 ccm 20 proz. Trichloressigsäure, 11 Uhr 35 Minuten vormittags; filtriert 2 Uhr 30 Minuten nachmittags.

Probe			Standard
[illegible] ccm Filtrat	wird gegen nebenstehendem Standard abgelesen		0,05 ccm 0,2 prom. Vesuvinlösung
1,35 „ n Natronlauge			2,50 „ 0,2 „ Salicylsäurelösung
1,00 „ 2 proz. Trichloressigsäure			2,00 „ 92 proz. Alkohol
0,65 „ 5 proz. $FeCl_3$-Lösung (violett)			1,00 „ 20 „ Trichloressigsäure
0,25 „ 5 proz. $FeCl_3$-Lösung			0,45 „ H_2O
2,50 „ 0,2 prom. Salicylsäurelösung			1,35 „ n NaOH
			1,00 „ 2 proz. Trichloressigsäure
			0,30 „ 5 „ $FeCl_3$-Lösung
			2,50 „ H_2O

Bei der Ablesung wurden folgende Werte erhalten: 15,9, 15,6, 15,7, 15,6, 15,8.

Das arithmetische Mittel dieser Zahlen ist 15,72.

$$X = \frac{20 \cdot 0,5}{3 \cdot 15,72} - \frac{0,5}{3}; \; X = 0,045 \text{ Prom.}$$

Nach dem Standardisieren der Methode wurden folgende Kontrollproben ausgeführt, wobei Liquor von Paralytikern verwendet wurde.

Nr.		Berechnete Konzentration Prom.	Gefundene Konzentration Prom.	Feh Pr
1	5 ccm Liquor + 1 mg Salicylsäure	0,200	0,201	0,
2	5 „ „ + 0,5 „ „	0,100	0,100	0,
3	5 „ „ + 0,2 „ „	0,040	0,039	2,
4	5 „ „ + 0,2 „ „	0,040	0,039	2,

Nach diesen Kontrollproben können also von in vitro zugesetz Salicylsäure 97,5 bis 100 Proz. wiedergefunden werden.

Literatur.

Brahme, Arsen in Blut und Cerebrospinalflüssigkeit. Stockholm 1923. *Devrient*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **90**, 242. — *Fiessinger* et *Debra* Comptes rendus hebdomadaires des séances et mem. de la soc. de biol. 336, 1922. — *Folin*, Laboratory manual of biol. chemistry 1923. — *F derichsen*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **80**, 235. — *Hanzlik* und *Wetz* Jahresber. d. Tierchem. **49**, 615, 1919 (Ref.). — *Hauptmann*, Klin. Wochensch 1925, S. 1629. — *Hérissey*, C. r. etc. **2**, 333, 1922. — *Redlich*, *Pötzl* und *He* Zeitschr. f. d. ges. Neurolog. u. Psychiatr. **2**, 715. — *Thoburn* and *Hanzli* Journ. of biol. Chem. **28**, 163, 1915.

Über die Abhängigkeit der Lage der Absorptionsstreifen eines gelösten Farbstoffes in verschiedenen farblosen Lösungsmitteln.

Von

Antonie Szilárd.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 21. Januar 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Zwischen dem Brechungsvermögen organischer Verbindungen und ihrer Konstitution wurden wichtige Beziehungen nachgewiesen. So hat man gefunden, daß Isomere, die eine verwandte Struktur aufweisen, dasselbe, Isomere, die verschiedenartig aufgebaut sind, ein sehr verschiedenes molekulares Brechungsvermögen haben können. Auf Grund von vergleichenden Untersuchungen an homologen Reihen ist es auch gelungen, den Anteil der Refraktion zu berechnen, der innerhalb organischer Moleküle einzelnen Atomgruppen, z. B. der Gruppe CH_2, oder den einzelnen Atomen wie O oder H oder C zukommt; ja sogar festzustellen, daß es diesbezüglich Unterschiede zwischen gesättigten C-Atomen und solchen gibt, die doppelt oder dreifach gebunden sind. Diese hochinteressanten Befunde, die bis etwa zum Jahre 1913 bei *Smiles*[1]) zusammengestellt sind, haben bereits des öfteren eine wichtige Verwertung gefunden, und zwar in Fällen, wo die Konstitution einer Verbindung auf anderem Wege nicht zu ermitteln war, bzw. zwischen zwei oder mehreren möglichen Konstitutionsformeln auf andere Weise nicht entschieden werden konnte.

Andererseits wurden ebenso wichtige Beziehungen zwischen der Konstitution organischer Verbindungen und ihrer Lichtabsorption, namentlich im ultravioletten (teils auch im ultraroten) Gebiete, aufgedeckt, die in manchen strittigen Fragen den Entscheid gebracht haben.

Die beiden oben erwähnten Gesichtspunkte, Brechungsvermögen einerseits und Lichtabsorption andererseits, wurden im Jahre 1878

[1]) *Samuel Smiles*, Chemische Konstitution und physikalische Eigenschaften; aus dem Englischen übersetzt von *P. Krassa*, bearbeitet und herausgegeben von *R. O. Herzog*, S. 263. Theodor Steinkopff, 1914.

einer experimentellen zusammenfassenden Betrachtung von *A. Kund*
unterzogen, der die Ergebnisse seiner Untersuchungen wie folgt darstel
„Hat ein farbloses Lösungsmittel ein beträchtlich größeres Brechun
und Dispersionsvermögen als ein anderes, so liegen die Absorptio
streifen einer in den Medien gelösten Substanz bei Anwendung des erst
Mittels dem roten Ende des Spektrums näher als bei Benutzung d
zweiten. Ein Medium, welches ein beträchtlich größeres Brechun
vermögen hat als ein anderes, besitzt in den meisten Fällen auch e
größeres Dispersionsvermögen, es wird sich experimentell daher se
schwer entscheiden lassen, ob das Brechungs- oder Dispersionsvermög
einer Substanz das Maßgebende für die Verschiebung des Absorption
streifens ist."

Nachstehend soll über Versuche berichtet werden, in denen d
Verschiebung der Absorptionsstreifen eines Farbstoffes im sichtbar
Spektrum bei Anwendung verschiedener farbloser Lösungsmitt
beobachtet wurde, und zwar teils von Lösungsmitteln, die zu ve
schiedenen homologen Reihen gehören, teils solche, an denen der Einflu
der Isomerie oder anderer Umstände geprüft werden sollte.

Vorbesprechung.

Der zu den Versuchen verwendete Farbstoff. Anstatt verschieden
Farbstoffe zu untersuchen, wie *Kundt* es tat, habe ich es vorgezogen
meine Untersuchungen an einer einzigen Substanz, an dem Dimethyl
ester des Hämatoporphyrins auszuführen, und zwar aus folgende
Grunde: Hämatoporphyrin in neutraler alkoholischer (oder i
alkalischer) Lösung, mit seinen vier schönen, über das ganze Spektru
verteilten Absorptionsstreifen wäre zu diesen Untersuchungen um s
eher geeignet, da gerade die Vielstreifigkeit seines Spektrums fest
zustellen erlaubt, ob von der Verschiebung in gewissen Lösungsmittel
die rot- bzw. blauwärts gelegenen Streifen in gleichem Grade betroffe
sind, oder nicht. Noch weit geeigneter als Hämatoporphyrin ist fü
solche Zwecke sein Dimethylester, der ebenfalls vier Absorption
streifen, und zwar nahezu an denselben Stellen hat, jedoch den Vorte
bietet, sich in Solvenzien zu lösen, in denen Hämatoporphyrin selbs
unlöslich ist.

Zunächst habe ich Hämatoporphyrin nach der Vorschrift von *Wil
stätter* und *Fischer*[2]) wie folgt hergestellt. Defibriniertes Pferde- oder Rinde
blut wurde zentrifugiert, die Blutkörperchen gewaschen, mit dem halbe
Volumen destillierten Wassers und mit Äther versetzt und hierdurc

---

1) *A. Kundt*, Über den Einfluß des Lösungsmittels auf die Absorptions
spektra gelöster absorbierender Medien. Ann. d. Phys. u. Chem., N. F.
4, 53, 1878.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 423, 1913.

lysiert. Nach entsprechend langem Stehen im Scheidetrichter wurde die das Oxyhämoglobin enthaltende wässerige Schicht abgelassen und durch Durchleiten von Luft vom Äther befreit. Inzwischen wurde ein Liter Eis-essig, dem 4,5 g Kochsalz zugesetzt waren, zum Sieden erhitzt, obige Hämoglobinlösung mit einer Geschwindigkeit von 300 ccm pro einer halben Stunde hinzufließen gelassen und nach weiteren 10 Minuten langem Sieden mit 500 ccm destillierten Wassers verdünnt, und zwar so, daß der Zufluß des Wassers $\frac{1}{4}$ Stunde lang dauerte. Nach 24stündigem Stehen war die Ausscheidung des Hämins beendet. Die darüber stehende Flüssigkeit wurde dekantiert, der Kristallbrei am Filter gesammelt, dort mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. 1 g des so gewonnenen Hämins wurde in 30 ccm *Kahlbaum*schen Bromwasserstoff-Eisessigs (spezifisches Gewicht bei 0° C 1,40) im Wasserbad von 40 bis 42° C durch $\frac{3}{4}$ Stunden geschüttelt, wobei Lösung eintrat, und über Nacht im Finstern stehengelassen. Dann wurde die ganze Flüssigkeit auf das Fünffache mit Wasser verdünnt, nach sechsstündigem Stehen mit essigsaurem Natrium gefällt, der Niederschlag am Filter chlor- und bromfrei gewaschen, endlich, um ihn auch ...nfrei zu bekommen, in ein wenig n/10 KOH gelöst, filtriert, aus der alkalischen Lösung mit einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure wieder gefällt, am Filter säurefrei gewaschen und getrocknet.

Aus dem so gewonnenen Hämatoporphyrin habe ich den Dimethylester nach drei aus der Literatur bekannten Methoden dargestellt.

a) *Präparat I.* Verfahren von *Nencki* und *Zaleski*[1]). In die Lösung von 0,30 g Hämatoporphyrin in 50 ccm absoluten Methylalkohols (Methanol Merck) wurde am Wasserbad bei aufgelegtem Rückflußkühler während einer halben Stunde trockenes Salzsäuregas eingeführt, die so erhaltene Lösung in Wasser, das essigsaures Natrium gelöst enthielt, eingegossen, der rote flockige Niederschlag am Filter gesammelt, chlorfrei gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

b) *Präparat II.* Verfahren von *E. Fischer* und *A. Speier*[2]). 0,5 g Hämatoporphyrin wurde mit einem Gemisch von 5 g absoluten Methyl-alkohols und 0,5 g konzentrierter Schwefelsäure durch 4 Stunden am Wasserbad bei aufgesetztem Rückflußkühler im Sieden erhalten und die so erhaltene schön rotviolette Lösung unter fortwährendem Umrühren in ... ccm destilliertes Wasser einfließen gelassen, worauf sich alsbald ein ...er Niederschlag bildete. Dieser wurde am nächsten Vormittag auf einem gehärteten Filter gesammelt, schwefelsäurefrei gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

c) *Präparate III bis VII* wurden nach der Vorschrift von *Küster* und *...hle*[3]) dargestellt; 0,40 g Hämatoporphyrin wurden in absolutem Methylalkohol, der 1 proz. Salzsäure enthielt, durch $\frac{1}{4}$ Stunde am Wasserbad bei aufgesetztem Rückflußkühler erhitzt, das Reaktionsprodukt in 300 ccm Wasser, in dem essigsaures Natrium gelöst war, eingegossen, der Niederschlag am Filter gesammelt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Der Dimethylester stellte, nach welcher immer der drei erwähnten Methoden bereitet, ein dunkelrotbraunes, amorphes Pulver dar; der Versuch, ihn nach *H. Fischer* durch Eingießen der Chloroformlösung in siedenden Methylalkohol zur Kristallisation zu bringen, war stets mißlungen. Die

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 30, 384, 1900.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 3252.

[3]) Zeitschr. f. phys. Chem. 86, 51, 1913.

verschiedenen Präparate zeigten identische Eigenschaften. Sie waren i Wasser und auch in kalten Alkalien gänzlich unlöslich; lösten sich ein wen in siedenden Alkalien. In Methyl-, Äthylalkohol, in Äther, Essigäthe Benzol und in Mineralsäuren waren sie gut löslich. Der Schmelzpunl betrug, am Präparat III bestimmt, 140 bis 142° C, an Präparat V 141° (also eine gute Übereinstimmung mit dem von *Küster* und *Deihle* angegebene Schmelzpunkt von 142° C. (Das Hämatoporphyrin, aus dem der Dimethy ester dargestellt wurde, war bei 275° C noch nicht geschmolzen.)

Davon, daß ich den reinen Dimethylester und nicht etwa mit unve ändertem Hämatoporphyrin oder mit dem Tetramethylester verunreinig Präparate in Händen hatte, habe ich mich auch durch die Methoxylbestin mung nach *Zeisel* überzeugt. Es lieferten

0,1813 g des Präparats V . . . . 0,1308 g AgJ (ber.: 0,1360 g)
0,1865 g „ „ VI . . . 0,1379 g AgJ („ 0,1399 g)
0,2168 g „ „ VII . . . 0,1603 g AgJ („ 0,1626 g)

Über das gleiche spektrale Verhalten der verschiedenen Präparat habe ich mich durch spektrophotometrische Bestimmung der Licht absorption im Gebiet der vier Absorptionsstreifen überzeugt. Vo den betreffenden Präparaten habe ich Lösungen in Chloroform her gestellt und dieselben in einem *König*schen Spektrophotometer geprüf Als Lichtquelle diente Gasglühlicht. Wie aus nachstehender Tabelle hervorgeht, in die ich die Maxima der Extinktionskoeffizienten *kursiv* eingetragen habe, wurden jene an den drei in dieser Hinsich untersuchten Präparaten (mit Ausnahme des ersten rotwärts gelegene Streifens an Präparat III) stets an derselben Stelle gefunden.

Tabelle I.

$\lambda = \mu\mu$	Präparat II ε	Präparat III ε	Präparat IV ε
628,0	0,560	0,503	0,634
625,3	*0,631*	0,524	*0,679*
622,6	0,615	*0,545*	0,659
621,3	0,504	0,504	0,616
618,9	0,533	0,474	0,558
578,5	0,704	0,697	0,776
576,2	0,751	0,756	0,853
575,3	0,817	0,807	0,860
574,4	*0,829*	*0,812*	*0,861*
573,4	0,818	0,777	0,830
537,6	0,501	0,539	0,593
536,0	0,582	0,556	0,605
535,1	*0,630*	*0,564*	*0,615*
534,3	0,613	0,549	0,596
533,6	0,611	0,542	0,544
531,5	0,564	0,514	0,528
504,8	0,432	0,478	0,505
503,5	0,502	0,499	0,516
502,9	*0,539*	*0,508*	*0,525*
502,3	0,507	0,499	0,519
501,6	0,503	0,487	0,506

Diese Maxima stimmen, namentlich die gegen Rot gelegenen, nicht
n mit den von *Schumm*[1]) erhaltenen überein. Doch ist zu bedenken,
ß gerade in diesem Spektralgebiet die Ablesungen in Intervallen von
hreren $\mu\mu$ erfolgten, daher die wirklichen Maxima irgend dazwischen
egen sein konnten. Durch die von mir angezeichneten Maxima soll
r auf die gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Prä-
raten hingewiesen sein.

Die verwendeten Lösungsmittel. Dem Erfordernis, daß die Prüfung der
bsorptionsstreifen in einer möglichst großen Zahl garantiert absolut
er, wasserfreier und gänzlich unzersetzter Lösungsmittel erfolge,
nnte ich infolge der Schwierigkeiten bei der Beschaffung des Materials,
esondere aber aus pekuniären Gründen nur teilweise nachkommen.
erkungen, die sich auf die Herkunft der von mir verwendeten Lösungs-
tel beziehen, sind jeweils bei der Besprechung der betreffenden Lösung
gebracht.

In den meine Ergebnisse enthaltenden Tabellen ist bezüglich jedes
ösungsmittels sowohl der auf Luft bezogene Brechungsindex n, wie
ch das molekulare Brechungsvermögen MR nach *Lorentz* und *Lorenz*
rechnet angegeben. Letzteres ist gleich $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{m}{d}$, wo mit n der auf
uft bezogene Brechungsindex, mit m das Molekulargewicht und mit d
as spezifische Gewicht bezeichnet sind. Bezüglich der meisten von mir
ntersuchten Lösungsmittel konnten die für $M R$ (bei 20° C und bei der
D-Linie) fertig berechneten Daten den *Landolt*schen Tabellen entnommen
erden; an den übrigen habe ich die auf Luft bezogenen Brechungsexponenten
ittels eines *Zeiss*schen Refraktometers, das mir von Herrn Prof. *Rybár*,
Direktor des II. physikalischen Instituts der hierortigen Universität, in
ebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt wurde, bestimmt und hieraus
en Wert M nach der oben angeführten Formel berechnet. Soweit solche
von mir bestimmte Werte in den nachfolgenden Tabellen vorkommen, ist
dies stets am betreffenden Orte vermerkt.

Apparatur und Ausführung der Ablesungen. Die Untersuchungen
wurden mittels eines *Zeiss*schen Gitterspektrometers vorgenommen unter
Benutzung einer Nitralampe als Lichtquelle; als Flüssigkeitsbehälter diente
eine Küvette mit planparallelen Wänden, deren Breitseiten auf den mittleren
hufeisenförmigen Teil nicht aufgeklebt, sondern bloß durch den Druck eines
federnden Rahmens festgehalten waren. Dadurch, daß die Küvette auf diese
Weise bei jedem Flüssigkeitswechsel in drei Teile auseinander genommen
werden konnte, war die Möglichkeit einer sehr genauen Reinigung gegeben.
Bezüglich des Gitterspektrometers sei noch erwähnt, daß es mit Rücksicht
auf die Leichtverschieblichkeit der Wellenlängentrommel geboten erschien,
die Lage der D-Linie möglichst oft, zuweilen sogar Tag für Tag zu kon-
trollieren; denn in der Tat war oft Wochen hindurch keinerlei Verschiebung,
zuweilen aber — offenbar infolge eines gelinden Stoßes, der den Apparat
getroffen hatte — eine solche von mehreren $\mu\mu$ zu konstatieren. Die Unter-
suchungen wurden stets so ausgeführt, daß die beiden Ränder der vier
Absorptionsstreifen der Reihe nach bestimmt wurden. Aus der Lage der
Ränder habe ich die Mitten der Absorptionsstreifen berechnet, die jedoch,

[1]) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 132, 56, 1923.

da die Streifen mehr oder minder asymmetrisch sind, nicht genau mit de
Absorptionsmaxima zusammenfallen, worüber Näheres aus den diesbezü
lichen Ausführungen bei *Kajdi*[1]) zu ersehen ist. Die Ablesungen wurde
an jeder Lösung mindestens dreimal, meistens öfter wiederholt, aus diese
Ergebnissen der Mittelwert berechnet und dieser in die nachstehenden Tabelle
eingetragen.

Die Ergebnisse meiner Versuche.

Ehe ich an die Einzelbeschreibung meiner Versuchsergebnis
gehe, sei vor allem festgestellt, daß sich diese mit den *Kundt*sche
insofern decken, als die Reihenfolge der Lösungsmittel, in denen ic
eine zunehmende Verschiebung der Absorptionsstreifen nach dem rote
Spektralende konstatieren konnte, dieselbe war, die *Kundt* gefunde
hatte. In nachstehende Zusammenstellung konnten natürlich nu
diejenigen Lösungsmittel Aufnahme finden, die sowohl bei *Kundt* al
auch bei mir vorkamen.

Bezüglich der *Kundt*schen Befunde habe ich einfach die Lösungs
mittel in der Reihenfolge angeführt, wie die Absorptionsstreifen in ihne
zunehmend nach dem roten Spektralende verschoben werden, vo
meinen Befunden aber der Einfachheit halber bloß die Lage der erste
Absorptionsstreifen in denselben Lösungsmitteln angegeben.

Kundt	*Szilárd* μμ
Methylalkohol	621,6
Äthylalkohol	623,0
Amylalkohol	622,9
Chloroform	623,6
Benzol	625,8
Toluol	626,2
Schwefelkohlenstoff	629,7

Auch muß bemerkt werden, daß bezüglich einzelner der von *Kund*
untersuchten Farbstoffe in obiger Reihenfolge die Stellung von Amyl
alkohol und Chloroform bzw. von Benzol und Toluol vertauscht ist

Endlich muß betont werden, daß alle *in den nachstehenden Tabelle*
angeführten Daten an Lösungen von Präparat V erhalten wurden.

A. *Homologe Reihe normaler Alkohole.* Zur Verwendung kame
Methyl- und Äthylalkohol, die beide nach allen Kautelen gereinigt un
von Wasser befreit waren (ich erhielt sie von Herrn Prof. *Gróh* a
der hiesigen tierärztlichen Hochschule und spreche ihm auch an diese
Stelle meinen wärmsten Dank aus); ferner n Propylalkohol (*Merck*
und *Kahlbaum*), n Butylalkohol (*Kahlbaum*), n Heptylalkohol (*Kahl*
baum) und n Oktylalkohol (*Kahlbaum* und *Schuchardt*). Die letzt
genannten vier Präparate hatten jahrelang in der Originalverpackung
im Finstern gestanden. Bezüglich des n Oktylalkohols sei erwähnt, daß

[1]) *L. Kajdi*, diese Zeitschr. **165**, 475, 1925.

die Ablesung der Absorptionsstreifen an dem *Kahlbaum*schen, die Bestimmung der Refraktion aber an einem frisch bezogenen *Schuchardt*schen Präparat erfolgt war.

Tabelle II.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I	II	III	IV
			μμ	μμ	μμ	μμ
Methylalkohol	1,3305	8,23	621,6	570,7	532,1	498,0
Äthylalkohol	1,3623	12,63	623,0	571,8	532,4	498,4
Propylalkokol	1,3854	17,52	622,7	572,2	533,1	498,9
Butylalkohol	1,3991	22,13	623,1	572,8	533,1	499,9
Heptylalkohol . . .	1,4253	36,09	624,7	574,7	533,7	500,2
Oktylalkohol	1,4314*)	40,64	625,2	574,8	533,8	499,5

*) Von mir selbst bestimmt.

Innerhalb der homologen Reihe sieht man mit steigendem Molekulargewicht den Brechungsexponenten und die molekulare Refraktion ansteigen, gleichzeitig aber auch, daß die Absorptionsstreifen nach dem roten Spektralende verschoben werden, wobei insgesamt bloß zwei Daten aus der Reihe der übrigen springen. Von der Verschiebung sind nicht alle Streifen gleichmäßig betroffen; an den beiden nach dem roten Spektralende zu gelegenen ist die Verschiebung etwa doppelt so groß wie an den beiden anderen.

B. *Homologe Reihe von Äthylestern.* Äthylacetat stand mir in Form eines *Kahlbaum*schen Präparats zur Verfügung; Äthylformiat, -propionat, -butyrat, -valerat und -capronat verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. *G. Buchböck*, Vorstand des dritten chemischen Instituts der hiesigen Universität. Die Herkunft dieser Ester war nicht mehr zu ermitteln; sie standen, seit Jahren in Flaschen mit Glasstopfen eingefüllt, in dem auch sonst vor Licht gut geschützten kühlen Präparatenraum, dessen Fenster zudem noch mit aktinischen Gläsern versehen sind.

Tabelle III.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I	II	III	IV
			μμ	μμ	μμ	μμ
Äthylformiat	1,3645*)	?	601,9	562,4	531,8	498,2
Äthylacetat	1,3727	22,25	623,7	574,1	531,5	497,6
Äthylpropionat	1,3848	26,90	624,1	574,8	532,3	497,9
Äthylbutyrat	1,3931	31,47	624,2	574,8	532,5	498,4
Äthylvalerat	1,3976*)	36,10	625,1	575,1	532,0	498,8
Äthylcapronat	1,4079*)	40,02	624,3	575,1	532,7	498,8

*) Von mir selbst bestimmt.

Wie aus Tabelle III ersichtlich, war, wie in der Alkoholreihe, :
Äthylacetat angefangen (über das Äthylformiat siehe weiter unte
neben dem parallelen Anstieg des Brechungsexponenten und
molekularen Refraktion auch eine Verschiebung der Absorptio
streifen gegen das rote Spektralende zu konstatieren, und waren
zufälligerweise auch hier bloß zwei Werte, die aus der Re
der übrigen sprangen. Im Gegensatz zu den Alkoholen v
aber die Verschiebung eine weit geringere, indem hier der Unt
schied zwischen dem höchsten und geringsten Wert auch
dem rotwärts gelegenen ersten Streifen bloß 1,4, an den übri
Streifen aber 1,0, 1,2 und 1,2 $\mu\mu$ betrug, während die Unterschi
in der Alkoholreihe an den beiden rotwärts gelegenen Streifen 3,6 u
4,1 $\mu\mu$ ausmachen.

Nun ergibt eine weitere Berechnung folgendes: Die molekul
Refraktion nimmt in der Alkoholreihe vom Ein- bis zum Achtkohlenst
alkohol um 32,4 zu, in der Esterreihe vom Ester mit der Zwei- bis z
Ester mit der Sechskohlenstoff-Alkoholkomponente um 17,8, wor
sich in der Alkoholreihe als Unterschied zwischen je zwei benachbart
Gliedern der Wert 4,6, in der Esterreihe nahezu wieder dasselbe, nämli
4,5 ergibt. Hingegen betragen die betreffenden Spannungen bezügli
des Brechungsexponenten in der Alkoholreihe 0,1009, in der Esterrei
0,0352; so daß sich als mittlerer Unterschied zwischen zwei benachbart
Gliedern der Alkoholreihe 0,0147, in der Esterreihe aber bloß 0,00
errechnen läßt. (Der tatsächliche Unterschied zwischen der mo
kularen Refraktion zweier benachbarter Glieder ist längs der ganz
Reihe weit konstanter, als der zwischen ihren Brechungsexponente
Es scheint also bezüglich der Verschiebung der Absorptionsstrei
eher ein Zusammenhang mit dem Brechungsexponenten als n
der molekularen Refraktion zu bestehen. Wie dem immer s
innerhalb jeder der beiden homologen Reihen besteht ein unverken
barer konsequenter Parallelismus zwischen Molekulargewicht, Brechun
exponent und molekularer Refraktion des Lösungsmittels einerse
und der Lage der vier Absorptionsstreifen in den betreffenden Lösung
andererseits.

Daß das abweichende Verhalten des Äthylformiats nicht dur
Ablesungsfehler verursacht oder etwa durch Unreinheit des Präpar
verschuldet war, geht daraus hervor, daß sich auch das Meth
formiat ebenso verhielt. Man hat den Eindruck, daß in dies
beiden Lösungen bereits eine Annäherung an das sau
Spektrum stattfindet, das am Hämatoporphyrin - Dimethylest
ähnlich wie am Hämatoporphyrin beschaffen ist. Ganz au
gesprochen ist dies der Fall am Äthyloxalat, wie aus nachstehend
Tabelle IV hervorgeht.

Tabelle IV.

Lösungsmittel	n_D	Mitte der Absorptionsstreifen I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
Äthylformiat	1,3506*)	602,8	562,7	530,1	501,1
Amylformiat	1,3645*)	601,9	562,4	531,8	497,2
Äthyloxalat	1,410	595,7	561,0	551,9	

*) Von mir selbst bestimmt.

C. *Vergleich zwischen normalen Alkoholen und den Estern mit der gleichen C-Zahl.* Zu diesem Vergleich standen mir drei Paare zur Verfügung, deren Daten in nachfolgender Tabelle V zusammengestellt sind.

Tabelle V.

Lösungsmittel	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
n-Butylalkohol	22,13	623,1	572,8	533,1	498,9
Äthylacetat	22,25	623,7	574,1	531,5	497,6
n-Heptylalkohol	36,09	624,7	574,7	533,7	500,2
Äthylvalerat	36,10	625,1	575,1	532,0	498,8
n-Oktylalkohol	40,64*)	625,2	574,8	533,8	499,5
Äthylcapronat	40,02	624,3	575,1	532,7	498,8

*) Von mir selbst bestimmt.

In dieser Tabelle ist je ein Alkohol mit dem Ester von derselben Kohlenstoffzahl vergesellschaftet; ihre molekulare Refraktion ist nahezu identisch, hingegen die Lage der Absorptionsstreifen eine verschiedene: Die beiden violettwärts gelegenen Streifen sind in der Esterlösung gegenüber der alkoholischen violettwärts, die beiden rotwärts gelegenen rotwärts verschoben. Nur in der dritten Gruppe erleidet diese regelmäßige Verschiebung eine Störung, und zwar infolge der offenbar unrichtig bestimmten Lage des ersten rotwärts gelegenen Streifens am Äthylcapronat, welcher Wert auch in Tabelle III aus der Reihe springt. Wenn hiervon abgesehen werden darf, so kann man füglich sagen, daß es sich hier um eine ziemlich sichergestellte Gesetzmäßigkeit handelt, um so eher, da die betreffenden Unterschiede überwiegend größer sind, als den zulässigen Fehlerquellen entspricht. Die Unterschiede betragen am

	I. Streifen $\mu\mu$	II. Streifen $\mu\mu$	III. Streifen $\mu\mu$	IV. Streifen $\mu\mu$
An dem je 4 C enthaltenden Paare	0,6	1,3	1,6	1,3
„ „ „ 7 C „ „	0,4	0,4	1,7	1,4
„ „ „ 8 C „ „	?	1,3	1,1	0,7

D. *Primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole.* Wäre der Parallelism zwischen molekularer Refraktion eines Lösungsmittels und Lage c Absorptionsstreifen des in ihm gelösten Farbstoffes eine Gesetzmäßigk von allgemeiner Gültigkeit, so hätte ich, da „Isomere mit ähnlich chemischer Natur und Struktur fast das gleiche ... molekula Brechungsvermögen besitzen" (*Smiles*), bei Verwendung obiger Isomer die Absorptionsstreifen stets an derselben Stelle finden müssen. Di war aber durchaus nicht der Fall. Es standen mir der normale, d sekundäre und tertiäre Butylalkohol (*Kahlbaum*sches Präparate) z Verfügung, deren molekulare Refraktion, wie auch aus nachstehend Tabelle VI ersichtlich, nahezu identisch ist. Ordnet man d für die Lage der Absorptionsstreifen erhaltenen Daten nach d Brechungsindizes, so ergibt sich laut Tabelle VI, daß die beid rotwärts gelegenen Streifen gegen das violette Spektralende ve schoben sind (*ein* aus der Reihe springender Wert an sekundäre Alkohol!), die beiden violettwärts gelegenen aber gegen das ro Spektralende.

Tabelle VI.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
tert. Butylalkohol . . .	1,3878	22,22	624,1	573,5	532,6	497,8
sek. „ . . .	1,3974	22,12	623,7	574,2	532,7	498,8
n „ . . .	1,3991	22,13	623,1	572,8	533,1	499,9

Diese Verschiebungen sind nicht sehr bedeutend, auch nicht gan regelmäßig, doch jedenfalls größer, als es den unvermeidlichen Versuch bzw. Ablesungsfehlern entspricht.

Beobachtungen am Isomerenpaar normaler und sekundärer Okty alkohol (*Kahlbaum*) ergaben kein klar zu deutendes Ergebnis (Ta belle VII).

Tabelle VII.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
sek. Oktylalkohol . . .	1,4244	40,56	625,0	573,7	533,8	499,0
n „ . . .	1,4314*)	40,64	625,2	574,8	533,8	499,5

*) Von mir selbst bestimmt.

Durch die Isomerie von der Art, wie sie bezüglich der normalen, sekundären und tertiären Butylalkohole besteht, wird also kaum ein Unterschied im molekularen Brechungsvermögen, wohl aber bezüglich der Lage der Absorptionsstreifen des gelösten Farbstoffes verursacht.

E. *Isomere mit verzweigten Kohlenstoffketten.* Von Alkoholen mit verzweigter Kohlenstoffkette stand mir leider nur ein einziger zur Verfügung, Isoamylalkohol mit dem Siedepunkt 131° C (*Merck*sches Präparat), daher sich die an ihm erhobenen Daten nur im Vergleich mit der unter A. besprochenen Reihe der normalen Alkohole verwerten lassen.

Leider fehlt in dieser Reihe gerade auch der normale Amylalkohol, so daß sich ein Vergleich nur auf folgende Weise anstellen läßt: An den normalen Alkoholen war vom Methyl- bis zum Butylalkohol mit der Zunahme des molekularen Brechungsvermögens eine zunehmende Verschiebung aller Absorptionsstreifen gegen das rote Spektralende wahrzunehmen. Vom Butyl- bis zum Isoamylalkohol nimmt das molekulare Brechungsvermögen um 4,6 zu, genau wie zwischen den jeweilig benachbarten normalen Alkoholen. Hingegen findet vom Butyl- bis zum Isoamylalkohol die erwartete Verschiebung nach dem roten Spektralende nur an einem einzigen Streifen statt; an zwei anderen Streifen erfolgt die Verschiebung nach dem blauen Spektralende (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
n-Butylalkohol	1,3991	22,13	623,1	572,8	533,1	499,9
Iso-Amylalkohol . . .	1,4084	26,74	622,9	572,1	533,9	499,5

Also kann das molekulare Brechungsvermögen eines primären Alkohols mit verzweigter Kohlenstoffkette den Wert haben, der seiner Kohlenstoffzahl entspricht, während die von ihm ausgeübte Beeinflussung der Lage der Absorptionsstreifen nicht seiner Kohlenstoffzahl entspricht.

F. *Isomere Ester.* Ich hatte Gelegenheit, einerseits die Isomeren Methylpropionat, Äthylacetat und Propylformiat (*Kahlbaum*sche Präparate), andererseits Isoamylpropionat (*Kahlbaum*) und Äthylcapronat (von Herrn Prof. *Buchböck*) zu vergleichen. Das Ergebnis

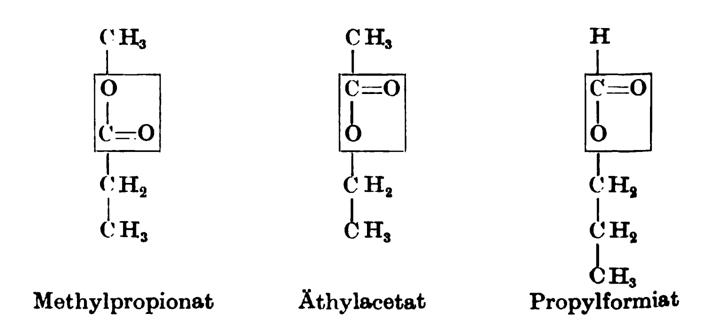
war, wie aus nachstehender Tabelle IX zu ersehen ist, an den zw
Isomerengruppen ein teilweise verschiedenes.

Tabelle IX.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
Methylpropionat . . .	1,3770	22,41	624,1	574,0	531,5	497,
Äthylacetat	1,3727	22,25	623,7	574,1	531,5	497,
Propylformiat	1,3784*)	22,13	623,3	573,9	532,4	498,
Isoamylpropionat . . .	1,4067*)	39,97	624,6	575,0	532,9	498,
Äthylcapronat	1,4079*)	40,02	624,3	575,1	532,7	498,

*) Von mir selbst bestimmt.

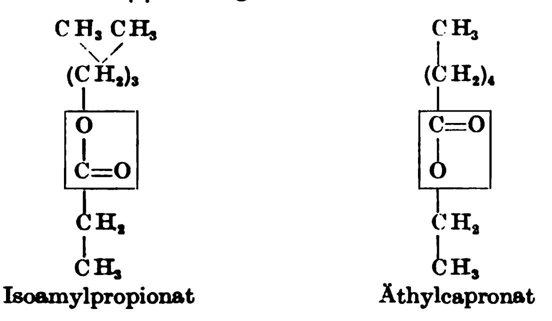
Brechungsindex und molekulares Brechungsvermögen sind a
den drei erstgenannten Isomeren sehr ähnlich; dem entspricht bezügli
der Lage der Absorptionsstreifen der sehr geringe Unterschied von 0,
0,1, 0 und 0,1 $\mu\mu$ zwischen Methylpropionat und Äthylacetat, währen
hingegen der Unterschied zwischen Äthylacetat und Propylformiat 0,
0,2, 0,9 und 0,8 $\mu\mu$ beträgt. Die Ursache des geringen Unterschiede
im ersten, des größeren im zweiten Falle dürfte davon herrühren, da
in der Lagerung der Alkylgruppen zwischen Methylpropionat un
Äthylacetat ein weit geringerer Unterschied besteht als zwischen diese
beiden Estern und dem Propylformiat, in welch letzterem Alkylgruppe
nur an *einem* Ende des Moleküls sich finden. Diese Verhältnisse werde
durch nachstehende Darstellungsart am besten charakterisiert.



Methylpropionat Äthylacetat Propylformiat

Ist diese Erklärungsart richtig, so müssen am anderen Isomerenpaa
(Isoamylpropionat und Äthylcapronat) die Unterschiede bezüglich de
Lage der Absorptionsstreifen nur gering sein, da ja im Aufbau diese
beiden Ester — abgesehen von der verzweigten C-Kette im ersteren —
dieselbe Analogie besteht, wie zwischen Methylpropionat und Äthylacetat

Dies ist laut Tabelle IX in der Tat der Fall, indem die Unterschiede bloß 0,3, 0,1, 0,2 und 0,2 $\mu\mu$ betragen.



G. *Ungleiche Beeinflussung der Lage der Absorptionsstreifen bei nahezu identischem molekularen Brechungsvermögen nicht isomerer Verbindungen.* Hierzu lieferte mir Chloroform und Schwefelkohlenstoff (von Herrn Prof. *Gróh* gereinigte Präparate) ein geradezu klassisches Beispiel, wobei allerdings bemerkt werden muß, daß nur das molekulare Brechungsvermögen an beiden Verbindungen nahezu identisch, der Brechungsindex aber gänzlich verschieden ist. Wie aus nachstehender Tabelle X hervorgeht, ist mit dem größeren Brechungsindex des Schwefelkohlenstoffs eine starke Verschiebung der Absorptionsstreifen nach dem roten Spektralende verbunden.

Tabelle X.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I $\mu\mu$	II $\mu\mu$	III $\mu\mu$	IV $\mu\mu$
Chloroform	1,4467	21,40	623,6	572,8	535,1	501,0
Tetrachlormethan	1,4607	26,51	628,0	576,7	535,9	502,4
Schwefelkohlenstoff . .	1,6276	21,36	629,7	579,3	541,9	507,5

Merkwürdigerweise ist diese Verschiebung an allen Streifen nahezu gleich groß; sie schwankt zwischen 6,1 und 6,8 $\mu\mu$.

Einen Übergang zwischen Chloroform und Schwefelkohlenstoff scheint das Tetrachlormethan zu bilden, indem hier gegenüber dem Chloroform die beiden rotwärts gelegenen Streifen stärker, die beiden violettwärts gelegenen weit schwächer rotwärts verschoben sind.

H. *Homologe Reihe aromatischer Verbindungen.* Benzol, Toluol und Xylol standen mir nur in dem Grade von Reinheit zur Verfügung, wie diese Präparate zu den üblichen Laboratoriumszwecken verwendet zu werden pflegen. Wie aus nachstehender Tabelle XI ersichtlich, ist mit zunehmendem molekularem Brechungsvermögen am ersten rotwärts

gelegenen Absorptionsstreifen eine regelmäßige, deutliche, am zweite und dritten Streifen eine weniger regelmäßige Verschiebung nach de roten Spektralende, am vierten keine zu konstatieren.

Tabelle XI.

Lösungsmittel	n_D	$M_D R$	Mitte der Absorptionsstreifen			
			I	II	III	IV
			μμ	μμ	μμ	μμ
Benzol	1,5014	26,18	625,8	575,5	534,7	500,6
Toluol	1,4992	31,06	626,2	575,4	535,1	500,8
Xylol	1,4996	35,90	626,7	576,4	535,1	500,8

Die oben ausführlich besprochenen Ergebnisse, die auch in nach stehender Abbildung wiedergegeben sind, lassen sich kurz wie folg zusammenfassen:

1. *Die Kundtsche Regel, wonach mit zunehmendem molekulare Brechungsvermögen farbloser Lösungsmittel die Absorptionsstreifen de gelösten Farbstoffe rotwärts verschoben werden, wird im allgemeinen bestätigt.*

2. *Innerhalb der homologen Reihe normaler Alkohole erleiden mit zunehmendem molekularen Brechungsvermögen der Lösungsmittel die Absorptionsstreifen des gelösten Farbstoffes eine zunehmende rotwärts gerichtete Verschiebung, die an den rotwärts gelegenen Streifen stärker ist als an den violettwärts gelegenen.*

3. *Auch innerhalb der homologen Reihe der Äthylester findet eine analoge Verschiebung statt, nur ist sie geringer als an den normalen Alkoholen.*

4. *n Alkohole und Äthylester mit derselben C-Zahl haben zwar annähernd dasselbe Brechungsvermögen, doch unterscheiden sie sich bezüglich der Lage des Absorptionsstreifen des in ihnen gelösten Farbstoffes. Von der Verschiebung in der Esterlösung im Vergleich mit der alkoholischen Lösung werden die rot- bzw. violettwärts gelegenen Absorptionsstreifen ungleichsinnig betroffen.*

5. *Eine ungleichsinnige Verschiebung der Absorptionsstreifen ist auch innerhalb der Reihe isomerer Alkohole (normal, sekundär, tertiär) anzutreffen.*

6. *Ein Alkohol mit verzweigter C-Kette hat sehr angenähert dasselbe molekulare Brechungsvermögen wie der normale Alkohol mit derselben C-Zahl; hingegen ist die Lage der Absorptionsstreifen des in beiden gelösten Farbstoffes eine verschiedene.*

7. *Die Lage der Absorptionsstreifen des in isomeren Estern (mit nahezu identischem molekularen Brechungsvermögen) gelösten Farbstoffes zeigt geringe Unterschiede, wenn die Ester auch strukturell möglichst*

...lich sind; bei struktureller Verschiedenheit sind die Unterschiede in ...r Lage der Absorptionsstreifen größer.

8. *Nichtisomere Verbindungen mit nahezu identischem molekularen ...rechungsvermögen können sich bezüglich der Lage der Absorptions- ...reifen des in ihnen gelösten Farbstoffes sehr verschieden verhalten.*

9. *Innerhalb der homologen Reihe der Benzole findet mit zunehmendem ...lekularen Brechungsvermögen eine Verschiebung der Absorptions- ...treifen des gelösten Farbstoffes nach dem roten Spektralende statt, nur ... sie weit geringer als innerhalb der homologen Reihe der normalen ...lkohole.*

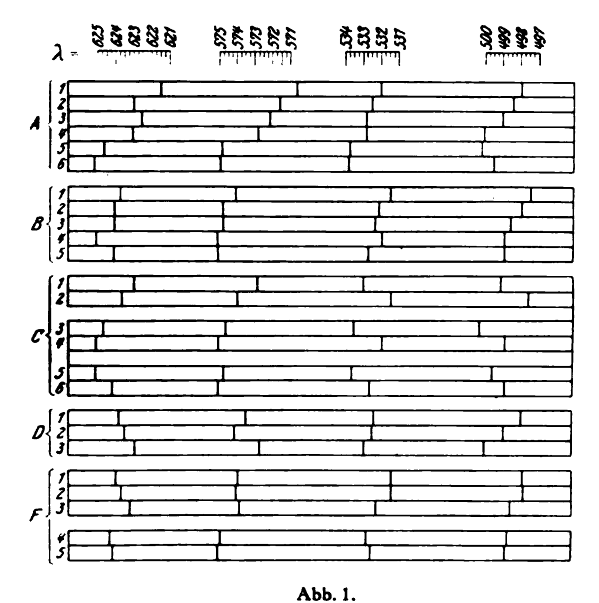


Abb. 1.

A) 1. Methylalkohol,
2. Äthylalkohol,
3. n-Propylalkohol,
4. n-Butylalkohol,
5. n-Heptylalkohol,
6. n-Octylalkohol.

B) 1. Äthylacetat,
2. Äthylpropionat,
3. Äthylbutyrat,
4. Äthylvalerat,
5. Äthylcapronat.

C) 1. n-Butylalkohol,
2. Äthylacetat,
3. n-Heptylalkohol,
4. Äthylvalerat,
5. n-Octylalkohol,
6. Äthylcapronat.

D) 1. tertiärer Butylalkohol,
2. sekundärer Butylalkohol,
3. normaler Butylalkohol.

F) 1. Methylpropionat,
2. Äthylacetat,
3. Propylformiat,
4. Isoamylpropionat,
5. Äthylcapronat.

Ohne auf die möglichen Ursachen der beschriebenen vielfältigen und nicht so ohne weiteres deutbaren Erscheinungen eingehen zu wollen, seien hier die Befunde von *Spring*[1]) erwähnt, denen auch solche

[1]) *W. Spring*, Receuil des travaux Chimiques des Pays-Bas et de la Belgique 16, (N. F. 1), 17, 1897.

von *Russel* und *Lapraik*[1]) vorangingen. *Spring* hat eine Reihe v
sogenannten farblosen organischen Lösungsmitteln in meterlan
Schichtdicke der spektroskopischen Prüfung unterworfen und A
sorptionsstreifen nachgewiesen, die innerhalb einer homologen Rei
um so näher dem roten Ende des Spektrums gelegen sind, je größer
C-Zahl der betreffenden Verbindung ist. In nachfolgender Reihe ist
so ziemlich nur der Methylalkohol, der diesbezüglich aus der Rei
springt. *Spring* fand die Absorptionsstreifen am

Methylalkohol	bei	639.5 $\mu\mu$		
Äthylalkohol	,,	633,7 ,,		
Propylalkohol	,,	635,7 ,,		
Isopropylalkohol	,,	634,5 ,,		
Isobutylalkohol	,,	636,1 ,,		
Amylalkohol	,,	638,1 ,,		
Benzol	,,	606,5	und	553,0 $\mu\mu$
Toluol	,,	613,0	,,	563,0 ,,
Xylol	,,	636,9	,,	611,0 ,,

Die von *Kundt* und nun auch von mir konstatierte Verschiebun
der Absorptionsstreifen eines Farbstoffes, wenn dieser in der homologe
Reihe von Alkoholen gelöst untersucht wird, ist mit dem *Spring*sche
Befund nicht identisch, bzw. *Kundts* und meine Befunde können au
dem Verhalten des reinen Lösungsmittels allein nicht erklärt werden
bedenke man doch die hundert- und mehrfach größeren Schichtdicken
die *Spring* anwenden mußte, um seine Absorptionsstreifen wahrnehmen
zu können. Verwandt bzw. auf eine gemeinsame Ursache zurück
zuführen dürften die beiderseitigen Erscheinungen — die mit zu
nehmender Molekulargröße erfolgende Verschiebung der eigenen Ab
sorptionsstreifen einerseits, und die Verschiebung der Absorptions
streifen des gelösten Farbstoffes andererseits — allerdings sein. So
kann man sich z. B. vorstellen, daß vielleicht in den Alkoholen, wenn
sie als Lösungsmittel mit dem gelösten Farbstoff in nähere Beziehung
treten (Solvatation), die Tendenz, mit zunehmender Molekulargröße
die Absorptionsstreifen rotwärts zu verschieben, so enorm gesteigert
wird, daß schon in 1 cm dicker Schicht dieselbe Wirkung zustande
kommt, wie in reinem Zustande erst in einer Schichtdicke von
mehreren Metern.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn
Prof. *Paul Hári* ausgeführt.

[1]) *J. W. Russel* et *W. Lapraik*, Journ. of the chem. Soc. **39**, 168, 1881;
zitiert bei *Spring*.

Tierische Kalorimetrie.

VII. Mitteilung:

Über den Einfluß des Hämatoporphyrins auf Körpertemperatur und Energieumsatz.

Von

Ladislaus Kajdi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 21. Januar 1926.)

Über das Vorkommen von Porphyrinen in Harn und Kot sowie auch in gewissen tierischen und pflanzlichen Gebilden haben die neuesten Untersuchungen mehr Klarheit geschaffen als noch vor einigen Jahren zu erhoffen war, desgleichen teilweise auch über die Provenienz so mancher dieser Stoffe. Die merkwürdigen Sensibilisierungserscheinungen, die nach Einbringung von Hämatoporphyrin an den Versuchstieren zu beobachten sind, wenn man sie dem Lichte aussetzt, sind ebenfalls allgemein bekannt. Unbeantwortet ist aber bis auf den heutigen Tag die Frage geblieben, ob den Porphyrinen eine Wirkung auf den Stoff- bzw. Energieumsatz zukommt, und wenn dies der Fall ist, in welcher Weise sich diese Wirkung äußert?

Denn es ist von vornherein durchaus nicht unmöglich, daß die Porphyrine als intermediäre Produkte in weit größeren Mengen gebildet werden als sie aus Harn und Kot erhalten werden können, indem sie bald nach ihrem Entstehen tiefer abgebaut werden. Während der noch so kurzen Dauer ihres Bestehens könnten sie aber den Stoff- und Energieumsatz in erheblichem Maße beeinflussen.

In den nachstehend zu beschreibenden Versuchen habe ich es unternommen, dieser Frage näherzutreten.

Einrichtung der Versuche.

Als Versuchstiere habe ich mit Ausnahme *eines* Tieres, das noch i
Wachstum begriffen war, erwachsene weiße Ratten verwendet. Nachde
ihr Grundumsatz in einer Anzahl von Vorversuchen nach der sofort z
beschreibenden Methode festgestellt war, habe ich ihnen selbstbereitet
Hämatoporphyrin (fürderhin abgekürzt als Hph bezeichnet) in 1 pro
Na_2CO_3 gelöst, *subkutan* beigebracht, wobei das Volumen der eingespritzt
Lösung meistens 1½ ccm, seltener bloß 1 bzw. 2½ ccm betrug, und wied
ihren Energieumsatz bestimmt.

Da es immerhin möglich war, daß durch die Injektion dieses Lösung
mittels allein schon eine Änderung im Energieumsatz eintritt, habe ich a
einigen Tieren erst die Wirkung der 1 proz. Lösung von Na_2CO_3 alle
geprüft und den Tieren erst später Hph injiziert.

Der Energieumsatz wurde in allen Versuchen indirekt durch Be
rechnung aus dem Sauerstoffverbrauch und dem respiratorischen Quotiente
ermittelt. Auch der O_2-Verbrauch wurde nicht direkt bestimmt, sonder
aus der Änderung des Körpergewichts und den Ausgaben des Tieres währen
der Versuchsdauer berechnet. Daß die so ermittelten Werte gut verwendba
sind, geht aus der Übereinstimmung der direkt bestimmten und des be
rechneten O_2-Verbrauchs in vielen aus diesem Institut mitgeteilten Ver
suchen hervor.

Die Dauer je eines Respirationsversuchs betrug in der Regel 7 bi
8 Stunden, ausnahmsweise auch bloß 6 bzw. auch bis zu 11 Stunden
Es muß ausdrücklich hervorgehoben werden, daß sich die Tiere während
der ganzen Versuchsdauer äußerst ruhig, beinahe unbeweglich verhielten
nur ab und zu änderten die bei der kritischen Temperaturgrenze in dem
ziemlich engen Käfig (siehe weiter unten) gehaltenen Tiere ihre Lage, um
dann sofort wieder in die beinahe starre Ruhe zu verfallen.

Einige Versuchstiere wurden Monate hindurch eiweißarm, bloß mi
Küchenabfällen gefüttert, aus denen ich die größeren Fleischstücke ent
fernte, andere erhielten täglich je 3 g Käse und Brot nach Belieben. Di
ganze Beobachtungsdauer betrug 1 bis 11 Monate. Während dieser langen
Zeit wurden die Respirationsversuche natürlich nicht täglich, sondern bloß
in Intervallen von mehreren Tagen bzw. Wochen ausgeführt. Dies hatte
unter anderem auch folgenden Grund: Nach den langjährigen Erfahrungen
die in unserem Institut gesammelt wurden, lassen sich an diesen kleinen
Versuchstieren gut vergleichbare Ergebnisse nur erhalten, wenn sie nach
einer angemessenen Hungerperiode von 15 bis 24 Stunden untersucht
werden. Da aber die Tiere schon während dieses kurzen Hungers stark an
Gewicht abnehmen, demzufolge auch ihr Energieumsatz bei öfter wieder
holtem, wenn auch kurzem Hungern fortlaufend abnimmt, wie dies von
Aszódi[1]) gezeigt wurde, habe ich einen nächsten Respirationsversuch erst
dann ausgeführt, nachdem das Tier durch längere normale Fütterung
wieder auf den ursprünglichen Stand gebracht wurde.

Zu den Respirationsversuchen habe ich die Apparatur verwendet, die
von *Aszódi*[2]) beschrieben, und auch von *Goto*[3]) benutzt wurde. Bezüglich-

---

[1]) *Z. Aszódi*, diese Zeitschr. **152**, 472, 1924.
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **113**, 70, 1920.
[3]) *K. Goto*, ebendaselbst **135**, 107, 1922.

r Einzelheiten dieser Apparatur sei auf die genannten Mitteilungen rwiesen und hier nur in aller Kürze folgendes mitgeteilt: Ein etwa Liter haltender Exsikkator diente als Respirationskasten, in dem sich das er auf einem in halber Höhe angebrachten Drahtnetz aufhielt, jedoch cht frei, sondern in einem kleinen Käfig eingeschlossen, mit dem zusammen vor und nach dem Versuche gewogen wurde. Durch die obere Öffnung s Exsikkators traten ein Thermometer, ein Quecksilbermanometer d zwei Glasröhren für die ein- bzw. austretende, durch eine Wasserstrahl-ftpumpe beförderte Ventilationsluft. Die eintretende Luft wurde mit nzentrierter H_2SO_4 von Wasserdampf, mit angefeuchtetem Natronkalk m CO_2 befreit. Auch der vom Tiere produzierte Wasserdampf wurde in nzentrierter H_2SO_4 bzw. das produzierte CO_2 in Natronkalk aufgefangen. Der vom Natronkalk abgegebene Wasserdampf wurde durch konzentrierte H_2SO_4 zurückgehalten.) Um zu kontrollieren, ob alles CO_2 aus der ntretenden Außenluft entfernt war bzw. alles vom Tier gebildete CO_2 aufgefangen ward, habe ich in beide Absorptionssysteme je eine ine Waschflasche mit Barytwasser eingeschaltet, bei der eintretenden ft zwischen H_2SO_4 und Natronkalk, bei der austretenden an-schließend an die Wasserstrahlluftpumpe. Versuche, in denen das arytwasser vor oder hinter dem Exsikkator sich getrübt hatte, wurden s mißlungen verworfen.

Alle Versuche wurden bei oder in der Nähe der für Ratten kritischen Temperaturgrenze ausgeführt, die *Goto*[1]) für diese Tiere bei 28° C gefunden at. Für konstante Versuchstemperatur war dadurch gesorgt, daß der Exsikkator mit dem Tiere ganz unter Wasser in einem großen Topf ver-enkt werden konnte. Die Anwärmung erfolgte vom Boden des Topfes her it einer kleinen Gasflamme.

Da die durch Hph gegen Licht sensibilisierten Ratten sich äußerst nruhig gebärden, was zu einer wesentlichen Steigerung des Energieumsatzes nd dadurch zu einer Entstellung der Versuchsergebnisse führen müßte, urde nicht nur der Behälter, in dem sich das Tier in den Zwischenpausen wischen je zwei Versuchen aufhielt, sondern auch der Topf mit dem Exsikkator und dem darin befindlichen Tier während der Versuche selbst n Finstern gehalten. Letzteres konnte durch Zudecken des Topfes erreicht erden.

Die Ventilation, etwa 50 bis 60 Liter pro Stunde, war so bemessen, laß die Bildung von Kondenswasser — außer etwaigen Undichtigkeiten, ie gefährlichste Quelle für Fehler in der Berechnung des Sauerstoff-erbrauchs — stets ausgeschlossen war. Trotzdem wurde vorsichtshalber während der letzten halben Versuchsstunde die Ventilation auf etwa 00 Liter pro Stunde gesteigert.

Auf die Gefahr hin, unvollständige Daten über das Verhalten der Körpertemperatur zu erhalten, habe ich diese nur an den Tagen bestimmt, n denen auch ein Respirationsversuch stattgefunden hat. Denn es war tets zu befürchten, daß die Tiere, da sie gegen Licht sensibilisiert sind, enn auch für kurze Zeit, doch öfter der Lichtwirkung ausgesetzt, in die kannte Unruhe verfallen, die dann die Brauchbarkeit sämtlicher nach-folgender Versuche beeinflussen könnte.

---

[1]) l. c.

Berechnung des Energieumsatzes.

Die Berechnung der Versuchsergebnisse war eine sehr einfache. Dadu daß sich die Tiere im Exsikkator nicht frei, sondern in den genann Käfig eingeschlossen befanden und am Beginn des Versuchs samt die Käfig, am Ende des Versuchs aber auch samt den allfälligen Dejek gewogen wurden, fielen alle Fehlerquellen weg, die sonst mit der gesonde Gewichtsbestimmung des Harns und des Kotes einherzugehen pfle

Der kalorische Wert des verbrauchten Sauerstoffs wurde den Tabel von *Magnus-Levy*[1]) entnommen.

Beschreibung der Versuche.

An einigen Tieren war das Ergebnis, nachdem die Respiratio versuche begonnen hatten, ein von Versuch zu Versuch sehr v schiedenes; an anderen Tieren mußten die Versuche, nachdem seit einiger Zeit bereits im Gange waren, aus äußeren Gründen längere Zeit unterbrochen werden. In ersterem Falle konnten Versuche nur von dem Tage an verwendet werden, an dem der Energ umsatz eine gewisse Konstanz aufwies; im zweiten Falle aber nur Versuche, die nach der Pause angeführt wurden.

Ferner konnten aus den S. 202 angeführten Gründen die Versuc nicht an einem jeden beliebigen Tage ausgeführt werden. Unliebsan Mängel ergaben sich auch daraus, daß ich in mehreren Versuchsreihe den entscheidenden Versuch aus äußeren Gründen (mißlungene Ve suche infolge von Fehlern in der Apparatur usw.) erst am zweiten Tag in anderen erst am dritten, fünften usw. Tage in einer Versuch reihe sogar erst am 17. Tage ausführen konnte. Diese Umstände hatt zur Folge, daß eine etwaige Einwirkung des Hph, sei es a die Körpertemperatur, sei es auf den Energieumsatz, sofern sie si bald nach erfolgter Einspritzung eingestellt hat und von kurzer Dau (wenige Stunden) war, dem Nachweis entgehen mußte.

Zu den Versuchen habe ich insgesamt 11 Tiere verwendet. A sieben Tieren habe ich je eine Versuchsreihe ausgeführt, an drei Tiere je zwei und an einem Tiere drei Versuchsreihen.

Ratte A (Weibchen).

Am 18. Februar 1923 zu den Versuchen eingestellt; Beobachtungsdaue 11 Monate; während dieser Zeit mit Küchenabfällen, bloß gegen Ende de ganzen Periode 2 Wochen lang mit Käse ernährt. Energieumsatz von Anfan an recht konstant: im Durchschnitt von 11 Vorversuchen 827 kg/ca pro 1 qm Körperoberfläche. Nach erfolgter Hph-Injektion konnten infolg

[1]) *Adolf Magnus -Levy* in Noordens Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels II. Aufl., 1, 207.

[illegible] Gebrechens am Apparat (Aufdeckung und Behebung des Fehlers, [illegible]versuche) die Respirationsversuche erst 17 Tage später wieder auf[illegible]ommen werden. Sie ergaben eine *Zunahme* des Energieumsatzes, die [illegible] 26, und während der nachfolgenden Monate *14 bis 25 Proz.* betrug. [illegible] an einem einzigen Versuchstage war der Energieumsatz infolge [illegible] Durchfalls unter den normalen Wert abgefallen.) Eine wesentliche [illegible]derung der Körpertemperatur war weder in den ersten 24 Stunden, [illegible] aber an den späteren Versuchstagen vorhanden. Das Tier blieb noch [illegible] 2 Monate nach Abschluß der Versuche bei bester Gesundheit, bis es, [illegible] einige andere meiner Versuchstiere, einer Leuchtgasvergiftung zum Opfer fiel.

Ratte B (Weibchen).

Am 4. März 1923 zu den Versuchen eingestellt; während der ganzen [illegible] Monate langen Beobachtungsdauer mit Küchenabfällen ernährt. Während [illegible] ersten Monats waren die Versuche hauptsächlich dadurch gestört, daß [illegible] Tier einige Junge zur Welt gebracht hatte, daher diese Versuche nicht [illegible]rücksichtigt werden konnten. Auch während der nun folgenden 3 Monate [illegible]den für den Energieumsatz einigermaßen schwankende Werte erhalten, [illegible] aber trotzdem den plausiblen Mittelwert von 800 kg/cal pro 1 qm Körperoberfläche ergaben. Nach erfolgter Hph-Injektion konnte, da das Tier 4 Tage später zugrunde ging, bloß ein Versuch ausgeführt werden, [illegible] weder eine Änderung im Energieumsatz, noch aber in der Körpertemperatur ergab.

Ratte C (junges Weibchen mit dem Anfangsgewicht von 80 g).

Am 28. März 1923 zu den Versuchen eingestellt. Beobachtungsdauer [illegible] Monate. Während der ersten 4 Monate mit Küchenabfällen, von da [illegible]ingend mit Käse ernährt. Eine Reihe von Vorversuchen konnte nicht [illegible]wendet werden, weil sie durch eine 3 Monate währende Versuchspause [illegible]brochen wurden; desgleichen auch drei Versuche nach einer ersten Hph-Injektion, da zwei ihr vorangehende Normalversuche so hohe Werte [illegible] über 900 cal) lieferten, wie sie an normalen nüchternen Tieren bei der kritischen Temperaturgrenze nicht vorzukommen pflegen. Während der dieser ersten Injektion folgenden 3 Wochen blieb der Energieumsatz [illegible] konstant auf der durchschnittlichen Höhe von 870 kg/cal pro 1 qm Körperoberfläche und hat sich bloß *unwesentlich geändert*, nachdem dem Tiere ein zweites Mal Hph injiziert wurde. Auch die Körpertemperatur zeigte weder nach der ersten, noch nach der zweiten Injektion eine wesent[illegible] Änderung. Das Tier ging etwa 2 ½ Monate nach Abschluß der Versuche [illegible]folge der erwähnten Leuchtgasausströmung zugrunde.

Ratte D (Weibchen).

Am 7. März 1923 zu den Versuchen eingestellt, blieb 9 Monate lang unter Beobachtung; nur in den letzten 7 Wochen mit Käse, sonst stets mit Küchenabfällen ernährt. Der Energieumsatz war in den ersten 2 Monaten schwankend, blieb während der nun folgenden 4 Monate konstant, trotzdem am Tiere inzwischen eine rasch wachsende Mammageschwulst auftrat, die operativ entfernt werden mußte. Im Durchschnitt von sieben Vorversuchen betrug der Energieumsatz 762 kg/cal pro 1 qm Körperoberfläche; war

in den ersten 24 Stunden nach der Hph-Injektion kaum verändert, s
aber nach Ablauf von 6 Tagen um *35 Proz.*, nach weiteren 6 Tagen
22 Proz. an, um während der nun folgenden 7 Wochen wieder wesentl
wenn auch nicht bis zu dem ursprünglichen Stand abzunehmen. Die Kör
temperatur zeigte weder am Tage der 35proz. Steigerung des Ener
umsatzes, noch auch später eine nennenswerte Änderung. Einer wie
holten Hph-Injektion erlag das Tier in 3 Tagen.

Ratte E (Weibchen).

Am 25. April 1923 zu den Versuchen eingestellt, während der 9 Mon
langen Beobachtungsdauer stets mit Küchenabfällen ernährt. Eine Re
von Vorversuchen, in denen sich der Energieumsatz während einer dazwisc
liegenden Versuchspause von 2 Monaten wesentlich verändert hatte, konn
eben aus diesem Grunde nicht als Normalversuche verwendet werden; w
aber zwei Versuche, zwischen denen zwar ebenfalls 2 Monate gelegen war
deren Ergebnisse aber recht gut übereingestimmt hatten und für d
Energieumsatz den Mittelwert von 853 kg/cal pro 1 qm Körperoberflä
ergaben. 4 Tage nach der Hph-Injektion hatte der Energieumsatz u
11 Proz. zugenommen. Nach einer zweiten Hph-Injektion war im Verla
des nächsten Monats eine *Steigerung* des Energieumsatzes bis zu *17 Pr*
zu konstatieren. Eine Änderung der Körpertemperatur war nach kein
der beiden Injektionen wahrzunehmen. Das Tier verendete 5 Woch
nach der zweiten Injektion.

Ratte F (Männchen).

Am 21. Juni 1924 zu den Versuchen eingestellt, 1 Jahr lang beob
achtet, während der ersten 3 Wochen mit Küchenabfällen, nachher m
Käse ernährt. Der Energieumsatz war von Anfang an konstant, betru
durchschnittlich 834 kg/cal pro 1 qm Körperoberfläche. Am Tage nac
der ersten Hph-Injektion *nahm* er um *19 Proz.*, nach einer zweiten um *4* un
5 Proz., nach einer dritten um *9 Proz. zu.* Die Körpertemperatur zeig
in allen drei Versuchsreihen an dem der Injektion folgenden Tage ei
mehr oder minder ausgesprochene Steigerung, die allerdings im nächste
Respirationsversuch nicht mehr zu beobachten war. Das Tier verende
5 Monate nach der dritten Injektion.

Ratte G (Männchen).

Am 25. Juni 1924 zu den Versuchen eingestellt und während de
ersten 2 Wochen der 5½ Monate langen Beobachtungsdauer mit Küche
abfällen, später stets mit Käse ernährt. Der Energieumsatz hatte sich i
fünf Vorversuchen auf den leidlich konstanten Wert von 820 kg/cal pr
1 qm Körperoberfläche eingestellt. 2 Tage nach erfolgter Hph-Einspritzun
war der Energieumsatz um *10 Proz.* angestiegen, in den nächsten Versuche
aber bereits unter die Norm abgefallen. Am Tage nach einer zweiten Hph
Einspritzung war eine *Zunahme* des Energieumsatzes um *18 Proz.*, an
drittnächsten Tage aber der Tod eingetreten. Die Körpertemperatur wie
sowohl nach der ersten, wie auch nach der zweiten Einspritzung eine
deutliche Zunahme auf.

Ratte H (Männchen).

Am 19. Novomber 1924 zu den Versuchen eingestellt und während de
bloß 1 Monat langen Beobachtungsdauer stets mit Küchenabfällen ernährt

ri Versuche ergaben einen relativ hohen Grundumsatz von durchhnittlich 880 kg/cal pro 1 qm Körperoberfläche und war auch die Körperperatur auffallend hoch. 24 Stunden nach erfolgter Hph-Injektion r der Energieumsatz bei weiterhin unveränderter Körpertemperatur um Proz. (!) *erhöht*, 48 Stunden später aber unter den Ausgangswert herabnken gefunden. An diesem Tage war an der Injektionsstelle eine tuierende Geschwulst sichtbar, die, nach Abschluß dieses Versuchs ffnet, einen serösen, von Hph gefärbten Inhalt ergoß. Weitere 24 Stunden iter war das Tier verendet.

Ratte J (Männchen).

Am 18. März 1925 zu den Versuchen eingestellt und während der Monate langen Beobachtungsdauer stets mit Küchenabfällen ernährt. rgieumsatz während der ersten Monate (infolge einer Cu-Vergiftung rch das schlecht verzinkte Drahtgitter?) sehr schwankend; während r nächsten 2 Monate leicht abnehmend, mit dem brauchbaren Mittelwert n 810 kg/cal pro 1 qm Körperoberfläche. (Wenn man einen ganz aus der ihe springenden Wert vernachlässigt, erhält man 829 kg/cal.)

Nach Einspritzung von 1½ ccm einer Na_2CO_3-Lösung allein nahm der ergieumsatz eher ein wenig *ab*, nach Hph-Einspritzung um *9 Proz. zu*. ie Körpertemperatur zeigte nach der Einspritzung des Alkalis eine geringe, ch der Hph-Einspritzung eine deutliche Steigerung. Das Tier verendete Monate nach der Hph-Injektion.

Ratte K (Männchen).

Am 22. Oktober 1925 zu den Versuchen eingestellt; während der mehr s 2 Monate langen Beobachtungsdauer stets mit Küchenabfällen gefüttert. ch eine Reihe aus technischen Gründen mißlungener Versuche gaben vier gelungene Versuche einen Mittelwert von 793 kg/cal pro qm Körperoberfläche. Nach der Einspritzung von 1,5 ccm einer 1proz. ung von Na_2CO_3 blieb der Energieumsatz *unverändert*, nach der Hphjektion nahm er um *4½ Proz.* zu. Die Körpertemperatur blieb nach der CO_3-Injektion unverändert und stieg nach der Hph-Injektion ein wenig . Am dritten Tage nach erfolgter Hph-Injektion war das Tier verendet.

Ratte L (Männchen).

Am 3. November 1925 zu den Versuchen eingestellt und während der Monate währenden Versuchsdauer mit Küchenabfällen ernährt. Nach er Reihe aus technischen Gründen mißlungener Versuche ergaben vier orversuche einen durchschnittlichen Energieumsatz von 774 kg/cal ro 1 qm Körperoberfläche. Nach der Injektion von 1½ ccm einer 1proz. ösung von Na_2CO_3 war der Energieumsatz 1 Tag hindurch um etwa Proz., nach der Hph-Einspritzung am nächsten Tage um *13 Proz. erhöht*, elche Erhöhung noch 6 Tage später bestanden hatte. Die Körpertemperatur ar nur am ersten der Hph-Injektion folgenden Tage etwas erhöht. Das ier ist zur Zeit der Abfassung dieser Zeilen am Leben und gesund.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Alle auf die Versuchsergebnisse bezüglichen Daten sind in der Generaltabelle am Ende der Texte enthalten; nachfolgend sind die Ergebnisse kurz zusammengefaßt.

Bei der großen Zahl von Versuchen, die ich ausführen mußte, es nicht zu verwundern, daß einige derselben aus technischen Gründ mißlungen sind; sie wurden, falls die Fehlerquelle sicher nachgewies werden konnte, einfach verworfen. Andere Versuche waren, na dem respiratorischen Quotienten beurteilt, sicher mit kleineren Mäng behaftet, ohne jedoch, daß die Ursache dieser Mängel erkannt word wäre; diese Versuche durften nicht weggelassen werden. Den respirato schen Quotienten konnte ich als Maßstab zur Beurteilung eines Versuc aus dem Grunde heranziehen, weil es sich ja stets um Hungertie gehandelt hat, an denen sich der Quotient in engen Grenzen etw über 0,7 hält; Werte, die wesentlich höher sind, werden entweder dur versuchstechnische Fehler oder aber durch pathologische Verhältnis des Tieres verursacht. Natürlich soll damit nicht gesagt sein, da umgekehrt jeder Versuch, in dem der Quotient plausible Werte au weist, eo ipso richtig sei; denn, falls, wie in meinen Versuchen, d O_2-Verbrauch nicht direkt bestimmt, sondern bloß berechnet wir verschiebt sich der O_2-Wert im großen und ganzen parallel dem fü die CO_2-Ausgabe ermittelten Wert, und zwar auch in dem Falle, wen letzterer mit einem größeren Fehler behaftet ist. Nun unterlaufen abe erfahrungsgemäß Fehler, wenn überhaupt, meist nicht bei der Be stimmung der CO_2-Produktion, sondern bei der der Wasserdampf abgabe und des Anfangs- und Endgewichts des Tieres (das samt dem Käfig gewogen wird). Diese Fehler ziehen aber, abweichend von den Fehlern in der Bestimmung der CO_2-Produktion, eine ausgesprochen starke Veränderung des Quotienten nach sich; daher darf nach stehender Statistik über das Verhalten dieses Quotienten in sofern ein realer Wert zugesprochen werden, als aus ih hervorgeht, daß nur in einer geringen Anzahl von insgesamt 147 Versuchen der respiratorische Quotient bzw. vielleicht auch der O_2-Verbrauch bzw. der aus diesen beiden berechnete Energie umsatz um einen gewissen, meist nur geringen Betrag fehlerhaft ist. Der Quotient betrug an

Ratte	A	in 22	Versuchen	einmal über 0,770 und einmal über 0,800.
,,	B	,, 8	,,	einmal unter 0,700.
,,	C	,, 9	,,	keinmal über 0,770.
,,	D	,, 15	,,	einmal über 0,770.
,,	E	,, 11	,,	zweimal über 0,770.
,,	F	,, 33	,,	viermal über 0,770, zweimal über 0,800.
,,	G	,, 14	,,	je einmal unter 0,700 und über 0,800.
,,	H	,, 4	,,	je einmal über 0,770 und über 0,800.
,,	J	,, 14	,,	je dreimal über 0,770 und über 0,800.
,,	K	,, 7	,,	einmal über 0,770.
,,	L	,, 10	,,	dreimal über 0,770.

Aus obiger Zusammenstellung ist ersichtlich, daß es verhältnismäßig wenige Versuche sind, in denen der respiratorische Quotient von dem Hungerquotienten abweicht; andererseits zeigen die in der Generaltabelle zusammengestellten Daten, daß die Hph-Injektion durch keinerlei Veränderung des Quotienten gefolgt war.

Das Verhalten der Körpertemperatur.

Die Körpertemperatur des Tieres habe ich an den Tagen, an denen ein Respirationsversuch stattfand, unmittelbar vor Beginn und nach Abschluß des Versuchs bestimmt[1]). Bei den vielfachen Fehlerquellen, die einer genauen Bestimmung der Körpertemperatur der kleinen Tiere hinderlich im Wege stehen [Unruhe des Tieres, Unmöglichkeit, das Thermometer stets genau gleich tief in den Mastdarm einzuführen, obzwar das Thermometer einen Gummiring trug, besonders aber die auch von *Goto*[2]) betonte Labilität der Körpertemperatur der Ratte], ist es selbstredend, daß Unterschiede von mehreren Zehntelgraden wohl meistens auf Rechnung obiger Unzukömmlichkeiten zu setzen, und nur größere Abweichungen im Sinne einer wirklichen Änderung einzuschätzen sind.

In der weiter unten folgenden Tabelle habe ich in jeder Versuchsreihe die mittlere Körpertemperatur in den Vorversuchen berechnet und mit diesem Mittelwert die mittlere Körpertemperatur am Tage des Respirationsversuchs nach der Hph-Injektion verglichen. Auf diese Weise ergab sich das zunächst wenig verständliche Ergebnis, daß an einer Reihe von Tieren die Injektion zu einer Erhöhung der

---

[1]) Es wäre unrichtig, zu verschweigen, daß bei diesen Bestimmungen ein systematischer, allerdings leicht richtigzustellender Fehler unterlaufen ist. Nachdem die Versuche bereits seit mehr als 1½ Jahren im Gange waren, fiel es auf, daß meine Ratten weit höhere Körpertemperaturen hatten, als eine ganze Reihe von anderen Tieren, an denen zur selben Zeit ein anderer Experimentator unter Verwendung eines anderen Thermometers Temperaturmessungen vornahm. Da dieses zweite Instrument sich bei der Prüfung als richtig erwiesen hatte, mußte der Verdacht aufkommen, daß mein Thermometer, das bereits länger als 10 Jahre im Institut vorhanden war, infolge der bekannten Altersänderungen unrichtig zeigte. Dieser Verdacht hat sich als richtig erwiesen, indem sich aus 19 im Meßbereich der Körpertemperatur ausgeführten vergleichenden Bestimmungen mit den beiden Thermometern ergeben hat, daß das von mir benutzte im Durchschnitt der genannten Versuche um 1,9° C zu hohe Werte ergab. Sämtliche weiter unten bzw. in der Generaltabelle angegebenen Körpertemperaturen sind um diesen Betrag korrigiert.

[2]) l. c.

Körpertemperatur führte, während sie an anderen Tieren unveränd blieb. Sieht man aber näher zu, so wird dieses Ergebnis leicht klärlich. Hph wurde in sechzehn Fällen injiziert; in acht Fällen fa eine Erhöhung der Körpertemperatur statt, und gerade diese a gehören zu den zehn Fällen, in denen die Temperaturmessung glei zeitig mit den Respirationsversuchen *innerhalb der ersten 2 Tage* na erfolgter Injektion vorgenommen wurde; während in allen Versuc reihen, die später ausgeführt wurden, die Temperaturerhöhung dur weg fehlte. Es läßt sich aus alledem schließen, daß die Hph-Injekti von einer Erhöhung der Körpertemperatur gefolgt wird, die jedo nicht allzulange dauert, so daß sie der Beobachtung entgehen mu wenn man die Messungen später als an den beiden ersten Tag vornimmt.

Daß aber die Temperaturerhöhung als allgemeine Wirkung d injizierten Hämatoporphyrins aufzufassen und nicht etwa einem lokal Prozeß an der Injektionsstelle zuzuschreiben ist, geht aus dem Umstan hervor, daß mit alleiniger Ausnahme der Ratte H an keinem Tiere au nur die geringste Spur einer lokalen Reaktion (Infiltratbildung, Schmer haftigkeit usw.) nachzuweisen war.

Änderungen im Energieumsatze.

Ich habe in allen Versuchsreihen den auf 1 qm Oberfläche un 24 Stunden reduzierten Energieumsatz von den der ersten Injektio vorangehenden Versuchstagen berechnet und diese Daten in de zweiten Stab nachfolgender Tabelle eingetragen. Da, wie erwähnt, al Respirationsversuche im Hungerzustand und bei oder in der Näl der kritischen Temperaturgrenze ausgeführt wurden, stellten je Werte den Grundumsatz der Tiere dar.

Er ist an Ratte D, J und K niedriger als an den übrigen Tieren, a denen er durchschnittlich 837 kg/cal beträgt, welcher Wert aber auc in dem Falle nicht wesentlich, auf 820 kg/cal, herabgedrückt wird, wen man jene niedrigen Werte mit in Rechnung bringt. Im fünften Stab derselben Tabelle ist die prozentuale Änderung berechnet, die de Energieumsatz der Tiere nach den Injektionen im Vergleich mit de Grundumsatz erfährt.

Vor allem ist es wichtig, festzustellen, daß durch die Injektio der 1proz. Lösung von Na_2CO_3 allein der Energieumsatz an Ratte und K überhaupt *unverändert geblieben* ist und an Ratte L eine blo geringe Steigerung um 5 Proz. erfahren hat, denn auf dieser Grund lage läßt sich sicher sagen, daß die meistens namhafte Steigerung

nach der Hph-Injektion in 14 von insgesamt 16 Versuchsreihen
[illegible]t, nicht vom Carbonate, sondern vom gelösten Hph herrührt.
[illegible] Ratte H, bei der diese Steigerung am Tage nach der Injektion
[illegible] Proz. betrug, will ich absehen, da ihre Körpertemperatur bereits
[illegible] den Vorversuchen (siehe Generaltabelle) erhöht war, daher das
[illegible]r nicht als völlig normal angesehen werden kann. An den übrigen
[illegible]ren *ist die Steigerung des Energieumsatzes von der allfälligen Er*[illegible]*ung der Körpertemperatur unabhängig*, denn letztere fehlte durch[illegible]
[illegible] an Ratte A, C, D und E, an denen Körpertemperatur und
[illegible]gieumsatz *nicht innerhalb der ersten 2 Tage* nach erfolgter Hph-[illegible]ktion, sondern erst später bestimmt wurden; während der Energie[illegible]tz an Ratte A, D und E besonders stark gesteigert war (von
[illegible]tte H mit der von Anfang an gesteigerten Körpertemperatur sei
[illegible]h hier abgesehen). Die Steigerung des Energieumsatzes war bald
[illegible] bloß kurzer Dauer (1 bis 2 Tage); in anderen Fällen dauerte sie
[illegible]t länger an. So war sie am Tiere D noch 12 Tage, am Tiere A sogar
[illegible] Tage später und auch noch weiterhin wahrzunehmen. Alles in allem
[illegible]ren es bloß zwei Tiere, die sich dem Hph gegenüber sowohl be[illegible]glich ihrer Körpertemperatur als auch bezüglich ihres Energie[illegible]satzes refraktär verhielten; es waren dies Ratte B und C. Zwischen
[illegible]er Menge des pro 1 kg Körpergewicht injizierten Hph und der
[illegible]nderung des Energieumsatzes war kein sicherer Zusammenhang
[illegible]chzuweisen.

Gegen die Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen
[illegible] Hph-Injektion und der Steigerung des Energieumsatzes könnte
[illegible] Ratte A ein scheinbar gewichtiger Einwand erhoben werden,
[illegible]in bestehend, daß, da das Körpergewicht dieses Tieres im letzten
[illegible]spirationsversuch vor der Injektion gegen 190 g und im ersten Ver[illegible]ch nach erfolgter Injektion nur mehr 158 g betragen hatte (welcher
[illegible]roße Gewichtsverlust offenbar hauptsächlich vom Fettgewebe mit
[illegible]em bekannt trägen Stoffwechsel getragen wird), die Steigerung des
[illegible]duzierten Energieumsatzes bloß von der relativen Anreicherung des
Körpers am höherwertigen, durch einen regeren Umsatz charakteri[illegible]sierten Eiweiß herrührt. Ähnliches ließe sich auch bezüglich Ratte E
[illegible]nwenden. Würden es nur diese beiden Tiere sein, die eine Steigerung
[illegible]es Energieumsatzes aufweisen, so hätte jener Einwand auch seine
[illegible]olle Berechtigung. Indessen ist an den übrigen Tieren, deren Energie[illegible]satz nach der Hph-Injektion eine Steigerung erfahren hat, eine
[illegible]hnliche Abnahme des Körpergewichts entweder überhaupt nicht,
[illegible]der aber in weit geringerem Grade eingetreten, so daß füglich
[illegible]sagt werden kann, daß *die Steigerung des auf die Einheit der Körperoberfläche bezogenen Energieumsatzes in der Tat durch das Hph* [illegible]*ursacht wurde.*

Text-Tabelle.

Ratte	Grundumsatz pro qm Körperoberfläche kg-Cal	Mittlere Körpertemperatur in den Vorversuchen °C	Injiziert	Körpertemperatur u. Energieumsatz, bestimmt nach d. Injektion	Nach der Injektion: Zunahme der Körpertemperatur °C	Nach der Injektion: Zunahme des Energieumsatzes Proz.	Tod des Tieres erfolgt
A	827 (Versuch 1-11)	35,3	0,075 g Hph = 0,42 g pro kg	17 Tage	0	26	7 Monate nach der Hph-Injektion an Leuchtgasvergiftung
				später	0	14—25	
B	800 („ 1—7)	35,5	0,08 g Hph = 0,40 g „ „	1 Tag	0	0	4 Tage nach der Hph-Injektion
C	870 („ 1—3)	35,3	0,055 g Hph = 0,32 g „ „	3 Tage	0	0	3 Monate nach der Hph-Injektion an Leuchtgasvergiftung
D	765 („ 1—7)	35,3	0,05 g Hph = 0,25 g „ „	6 „	0	35	3 Tage nach einer wiederholten Injektion
				12 „	0	22	
E	853 („ 1—2)	34,6	1. 0,03 g Hph = 0,15 g „ „	4 „	0	11	5 Wochen nach der zweiten Hph-Injektion
		35,7	2. 0,06 g Hph = 0,34 g „ „	5 „	0	17	
F	834 („ 1—5)	35,9	1. 0,076 g Hph = 0,32 g „ „	1 Tag	0,9	19	
		35,2	2. 0,03—0,04 g Hph = 0,12-0,2 g pro kg	1 „	1,4	4	5 Monate nach der dritten Hph-Injektion
		35,2	3. 0,040 g Hph = 0,17 g „ „	1 „	1,9	9	
G	820 („ 1—5)	35,9	1. 0,076 g Hph = 0,33 g „ „	2 Tage	0,7	10	
		35,6	2. 0,05—0,06 g Hph = 0,25-0,3 g pro kg	1 Tag	1,2	18	3 Tage nach der zweiten Hph-Injektion
H	880 („ 1—2)	37,1	0,05 g Hph = 0,23 g „ „	1 „	0	44	4 Tage nach der Hph-Injektion
J	810 („ 1—6)	35,7	1. 1,5 ccm Na_2CO_3	1 „	0,3	0	5 Monate nach der Hph-Injektion
			2. 0,06 g Hph = 0,36 g pro kg	1 „	1,4	9	
K	793 („ 1—4)	35,7	1. 1,5 ccm Na_2CO_3	1 „	0	0	3 Tage nach der Hph-Injektion
			2. 0,06 g Hph = 0,25 g pro kg	1 „	0,7	$4^1/_2$	
L	774 („ 1—4)	36,2	1. 1,5 ccm Na_2CO_3	1 „	0	5	Derzeit noch am Leben
			2. 0,08 g Hph = 0,42 g pro kg	1 „	0,7	13	

Endlich muß noch der Umstand geklärt werden, ob nicht der an
igen Tieren bald nach der Injektion erfolgte Tod die Beweiskraft
ener Versuche bzw. der aus ihnen gezogenen Schlüsse insoweit beein-
chtigt, als man geneigt wäre, etwa anzunehmen, daß alle Tiere schwer
giftet waren. Demgegenüber sei angeführt, daß, wie aus der Tabelle
chtlich ist, a) bloß drei Tiere, B, H und K, innerhalb 4 Tagen nach
r ersten Injektion zugrunde gingen; b) daß gerade an den rasch
endeten Ratten B und K der Energieumsatz gar nicht bzw. weit
niger als an den übrigen Tieren erhöht war; c) daß von den Tieren
t dem stark gesteigerten Energieumsatz Ratte A die Hph-Injektion
Monate überlebte, Ratte D, E und G erst einer zweiten Hph-
ktion zum Opfer fielen, Ratte F sogar eine dritte Hph-Injektion
5 Monate überlebte; d) daß die Ratten gerade in den soeben
nannten Versuchsreihen mit der starken Steigerung des Energie-
msatzes an den Tagen nach der Hph-Injektion stets munter waren,
weit sie nicht zu Zwecken eines bevorstehenden Respirations-
rsuches hungern mußten, mit gewohnter Gier die ihnen vorgelegte
ahrung verzehrten und erst Wochen und Monate später teils aus
bekannten Gründen (offenbar Altersschwäche), teils infolge einer
fälligen Leuchtgasausströmung eingingen.

Die Ergebnisse meiner Versuche lassen sich wie folgt zusammen-
assen:

1. *Durch Hämatoporphyrin, das man weißen Ratten in einer 1 proz. Lösung von Na_2CO_3 gelöst unter die Haut spritzt, wird ihre Körper-mperatur und ihr Energieumsatz gesteigert.*

2. *Die Steigerung der Körpertemperatur ist von kurzer Dauer und wird von der des Energieumsatzes oft vielfach überdauert.*

3. *Hieraus folgt, daß der gesteigerte Energieumsatz nicht ein Folge-stand der erhöhten Körpertemperatur ist, sondern daß beide durch das einverleibte Hämatoporphyrin verursacht werden.*

4. *In der Art des gesteigerten Stoffumsatzes findet keinerlei Ver-änderung statt, soweit dies aus dem unveränderten respiratorischen Quotienten gefolgert werden kann.*

5. *Das als Lösungsmittel für das Hämatoporphyrin verwendete Na_2CO_3 hat keinen Anteil an der Steigerung der Körpertemperatur und des Energieumsatzes.*

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn
Prof. *Paul Hári* ausgeführt.

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs	Mittlere Temperatur im Exsikkator	Dauer des Hungers	Mittleres Körpergewicht	Körpertemperatur		Gew (ein
						zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs	zu Be d Vers
		Stunden	°C	Stunden	g	°C	°C	
	1923							
1	18. II.	8,50	28,0	36	185,39	34,7	34,7	670
2	27. II.	9,46	28,3	36	184,07	35,8	35,5	657
3	15. III.	9,18	28,5	18	179,12	34,2	35,8	664
4	3 IV.	9,28	28,2	18	176,36	35,2	35,0	635,
5	28. IV.	7,76	27,8	20	173,60	35,1	35,1	653,
6	27. V.	8,53	28,2	20	184,39	35,8	35,6	538,
7	4. VI.	9,00	28,1	14	181,96	35,3	35,3	646,
8	11. VI.	8,00	28,0	18	180,53	35,3	35,2	630,
9	25. VI.	8,22	28,0	15	178,01	35,3	35,4	522,
10	15. VIII.	8,12	28,0	17	196,78	35,2	35,5	656,
11	24. VIII.	7,88	28,0	15	190,38	34,9	35,6	634,7
12	29. IX.	8,03	27,6	17	158,22	34,9	35,7	609,9
13	6. X.	8,93	27,9	14	151,14	34,8	34,9	615,0
14	14. X.	8,45	28,0	15	151,71	34,3	34,3	598,6
15	20. X.	8,72	27,5	14	140,91	32,6	32,8	594,7
16	27. X.	7,00	28,0	17	160,04	34,7	36,8	607,5
17	2. XI.	6,45	28,0	19	160,53	34,5	34,9	604,6
18	18. XI.	8,08	28,2	15	165,58	33,6	35,2	625,8
19	22. XI.	8,58	28,1	15	159,61	34,5	35,3	614,5
20	13. XII.	9,58	28,1	15	162,83	34,2	35,7	606,8
	1924							
21	5. I.	7,75	28,2	16	163,09	34,9	35,4	618,3
22	18. I.	8,72	28,0	16	150,50	34,7	34,7	598,8
	1923							
1	1. V.	8,88	28,0	15	203,31	35,6	35,5	690,9
2	28. V.	7,93	28,3	19	206,68	35,3	35,8	680,3
3	12. VI.	7,58	28,0	16	201,04	35,7	35,3	651,3
4	23. VI.	8,04	28,0	16	197,61	35,4	35,3	643,1
5	3. VII.	7,83	28,0	17	199,34	35,4	35,3	655,9
6	14. VIII.	8,22	28,1	16	209,88	35,5	35,5	669,46
7	23. VIII.	8,20	27,8	16	204,34	35,2	35,6	648,13
8	11. IX.	7,62	28,0	18	198,32	35,2	34,4	648,61

Versuchs		Respiratorischer Quotient	Pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht			Energieumsatz pro 24 Stdn. und		Bemerkungen
	verbraucht		ausgegeben		verbraucht	1 kg Körpergewicht	1 qm Körperoberfl.	
	O_2		H_2O	CO_2	O_2			
	g		g	g	g	kg-Cal	kg-Cal	
6	2,424	0,778	40,91	39,39	36,91	122	768	
[illegible]	2,842	0,752	37,66	40,50	39,16	129	810	
2	2,692	0,762	40,12	41,20	39,28	130	804	
8	2,956	0,728	55,07	43,38	43,33	142	895	
4	2,362	0,727	41,88	42,06	42,08	138	848	
1	2,828	0,728	43,90	43,20	43,15	141	884	
1	2,723	0,737	43,12	40,46	39,91	131	815	
9	2,376	0,734	42,99	39,86	39,48	129	804	
0	2,576	0,734	45,23	42,67	42,27	139	844	
5	2,550	0,737	47,56	38,85	38,32	126	804	
4	2,478	0,729	42,44	39,72	39,63	130	820	
6	2,826	0,732	71,38	53,74	53,36	175	1040	12. IX. 0,075 g Hph subkutan
9	2,905	0,763	75,48	54,20	51,64	171	999	
2	2,618	0,725	60,77	48,90	49,01	160	940	
3	2,048	0,849	60,29	46,76	40,11	136	774	Durchfall
[illegible]	2,468	0,755	64,80	54,91	52,87	174	1040	
[illegible]	2,290	0,725	62,03	52,94	53,08	174	1037	
70	3,027	0,737	55,53	55,05	54,28	178	1075	
00	2,998	0,752	60,23	54,31	52,52	173	1032	
13	3,381	0,713	62,57	50,96	52,00	170	1021	
06	2,800	0,755	61,94	55,22	53,17	175	1053	
48	2,879	0,770	65,15	55,76	52,67	174	1019	
29	2,870	0,768	40,16	40,27	38,15	126	816	
73	2,832	0,688	47,14	39,14	41,88	137	890	
84	2,292	0,756	53,50	37,53	36,08	119	766	
76	2,422	0,744	50,09	37,40	36,59	120	770	
36	2,525	0,745	59,01	39,75	38,81	128	819	
03	2,518	0,752	51,84	36,22	35,04	115	754	
50	2,569	0,750	58,14	37,99	36,80	121	785	
446	2,400	0,737	49,48	38,87	38,14	125	802	10. IX. vormitt. 0,08 g Hph subk.

G…

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs	Mittlere Temperatur im Exsikkator	Dauer des Hungers	Mittleres Körpergewicht	Körpertemperatur zu Beginn des Versuchs	Körpertemperatur am Ende des Versuchs	Gew… (ein…) zu Be… des Vers…
		Stunden	°C	Stunden	g	°C	°C	g
	1923							
1	27. XI.	8,82	28,5	14	118,04	34,6	?	572,
2	7. XII.	8,18	28,0	15	129,33	35,9	35,6	585,
3	15. XII.	7,78	28,1	16	131,33	35,9	36,2	574,
4	21. XII.	7,55	28,0	15	129,55	35,7	35,9	583,
5	28. XII.	7,93	28,2	15	128,17	36,4	36,1	584,
	1924							
6	3. I.	8,28	28,2	16	132,03	36,1	36,3	584,
7	10. I.	7,16	28,0	16	135,72	35,3	35,8	581,
8	17. I.	8,48	28,2	16	137,05	34,9	?	584,
9	24. I.	8,10	28,2	16	135,06	35,3	35,9	601,
	1923							
1	29. V.	5,51	27,8	21	223,61	35,7	35,9	729,3
2	6. VI.	8,05	28,0	15	220,59	35,0	35,1	673,5
3	13. VI.	8,00	27,8	15	217,13	34,8	35,7	660,5
4	3. VII.	7,53	28,0	19	212,64	34,8	35,3	556,81
5	13. VIII.	7,92	28,0	16	244,39	34,6	35,5	693,97
6	21. VIII.	8,00	28,1	15	241,17	35,0	35,2	685,51
7	30. IX.	8,05	28,0	15	211,81	35,3	35,8	674,1
8	7. X.	7,62	28,2	16	200,38	33,4	?	663,3
9	13. X.	9,86	28,0	14	190,95	35,2	35,1	637,6
10	19. X.	8,26	28,1	15	187,18	34,8	34,8	636,2
11	26. X.	8,43	28,3	17	189,06	34,3	35,3	635,6
12	6. XI.	8,93	28,0	15	209,72	34,9	35,3	670,5
13	19. XI.	7,96	28,0	15	222,64	35,3	34,9	682,7
14	9. XII.	6,73	28,2	16	212,06	35,3	35,8	668,6
15	16. XII.	7,72	28,1	16	211,28	35,4	36,0	655,27
	1923							
1	18. VIII.	7,16	28,0	17	165,23	34,9	35,4	609,74
2	17. X.	7,63	27,6	16	180,12	33,7	34,6	628,93
3	22. X.	8,12	28,0	16	175,26	34,0	35,3	627,80
4	28. X.	9,05	28,1	15	180,28	34,4	35,0	625,87
5	8. XII.	7,05	28,1	17	185,28	35,9	36,1	641,99
6	14. XII.	7,43	28,1	16	177,60	34,7	36,1	621,50
7	22. XII.	8,41	28,0	15	171,53	34,1	?	646,03
8	29. XII.	7,28	28,1	16	166,55	34,1	35,9	623,01
	1924							
9	4. I.	7,03	28,0	16	167,90	34,9	35,9	620,83
10	11. I.	7,78	28,0	16	158,78	33,5	35,3	605,73
11	16. I.	9,32	28,1	15	157,81	33,9	35,9	605,02

Versuchs		Respiratorischer Quotient	Pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht			Energieumsatz pro 24 Stdn. und		Bemerkungen
	verbraucht O_2		ausgegeben		verbraucht O_2	1 kg Körpergewicht	1 qm Körperoberfl.	
			H_2O	CO_2				
...2	g		g	g	g	kg-Cal	kg-Cal	
10	2,166	0,746	69,33	51,20	49,95	130	886	
13	2,142	0,723	59,17	48,60	48,58	159	883	
14	1,956	0,734	61,09	46,35	45,93	151	842	
11	1,859	0,762	52,95	47,87	45,61	151	838	17. XII. mittags 0,055 g Hph subkutan
18	2,056	0,749	60,85	49,99	48,53	160	886	
15	2,158	0,756	55,59	49,27	47,36	156	874	
14	1,937	0,752	59,30	49,45	47,80	158	890	
17	2,131	0,740	50,66	44,73	43,99	144	819	
56	2,072	0,757	53,20	46,91	45,09	145	838	
63	1,882	0,758	36,10	38,24	36,66	121	807	
35	2,639	0,726	47,25	35,60	35,60	117	793	
33	2,328	0,791	34,33	35,00	32,16	107	707	
46	2,442	0,729	35,31	36,66	36,60	120	786	
46	2,623	0,734	38,17	32,83	32,54	106	733	
61	2,730	0,736	32,45	34,34	33,99	111	762	
77	2,519	0,744	32,40	36,27	35,46	117	764	
77	2,342	0,751	33,58	37,38	36,83	121	782	7. X. vormittags 0,05 g Hph subkutan
00	3,911	0,725	54,79	49,68	49,82	163	1032	
23	2,892	0,760	55,82	46,89	44,86	148	931	
73	2,739	0,736	38,18	41,74	41,23	135	853	
26	2,939	0,754	32,83	38,77	37,65	124	811	
72	2,783	0,750	45,33	38,86	37,66	124	826	
60	2,301	0,746	39,01	39,67	38,68	127	834	
673	2,601	0,747	37,66	39,35	38,29	126	859	
110	2,093	0,733	56,00	42,77	42,33	139	839	
548	2,420	0,765	51,36	44,48	42,24	140	867	
856	2,775	0,748	49,42	48,19	46,83	154	948	11. X. vormittags 0,03 g Hph subkutan
877	2,869	0,729	54,31	42,32	42,20	138	858	
376	2,337	0,739	49,26	43,66	42,94	141	883	
570	2,447	0,763	56,30	58,82	44,49	147	908	
971	2,817	0,767	66,76	49,39	46,83	155	946	17. XII. mittags 0,06 g Hph subkutan
515	2,359	0,775	57,06	49,76	46,67	155	936	
739	2,552	0,780	59,41	55,67	51,87	172	1044	
671	2,572	0,755	66,05	51,87	49,95	165	980	
269	3,190	0,745	55,36	53,36	52,08	171	1017	

Ge

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs	Mittlere Temperatur im Exsikkator	Dauer des Hungers	Mittleres Körpergewicht	Körpertemperatur		Gew. (ein
						zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs	zu Be de Versı
		Stunden	°C	Stunden	g	°C	°C	g
	1924							
1	21. VI.	8,00	28,0	16	211,86	36,8	36,1	666,
2	30. VI.	8,00	28,1	17	195,65	35,2	36,0	660,
3	31. VII.	7,76	28,0	17	239,59	34,7	35,3	704,
4	15. VIII.	8,03	28,1	15	254,97	36,3	36,4	740,
5	13. IX.	7,38	28,0	15	267,36	36,3	35,8	751,
6	23. IX.	7,42	28,3	16	261,88	36,5	37,1	713,
7	28. IX.	7,55	28,0	16	232,85	35,8	36,0	676,
8	12. X.	6,52	28,0	16	254,64	35,6	35,4	711,
9	18. X.	8,31	28,0	15	243,79	34,6	35,7	696,
10	25. X.	7,99	28,1	15	245,51	34,9	35,3	697,
11	30. X.	7,10	27,8	15	240,30	34,8	34,6	712,
12	6. XI.	7,38	28,0	15	243,89	35,3	35,8	714,
13	11. XI.	8,80	28,0	15	241,51	37,4	35,8	712,
14	14. XI.	7,28	28,0	15	235,08	35,4	35,7	686,
15	27. XI.	7,43	28,3	15	235,50	36,4	36,7	684,
16	10. XII.	7,00	28,2	15	240,71	36,7	36,9	703,
17	31. XII.	8,38	27,4	15	236,43	36,3	36,1	695,
	1925							
18	6. I.	6,61	28,2	17	242,22	36,5	36,9	700,
19	18. I.	7,72	27,6	15	228,19	35,7	35,7	684,
20	5. II.	6,95	27,8	16	234,48	35,3	36,4	697,
21	14. II.	6,18	27,7	15	242,54	37,7	37,8	703,
22	16. II.	7,66	28,0	14	230,74	35,3	36,5	692,
23	21. II.	8,28	28,2	15	225,60	35,7	35,9	687,
24	1. III.	7,16	28,0	16	204,39	35,4	36,2	668,
25	17. III.	6,18	28,0	17	213,26	35,4	36,6	670,
26	23. III.	7,18	28,0	16	205,38	35,4	35,8	660,
27	22. IV.	7,58	27,1	14	179,53	35,3	35,7	628,
28	8. V.	8,18	28,0	14	194,04	35,5	36,2	660,
29	19. V.	10,25	27,8	14	198,65	35,0	36,4	657,
30	23. V.	9,05	28,0	14	200,93	34,7	35,9	678,
31	9. VI.	8,28	28,3	14	230,36	35,9	35,7	687,
32	25. VI.	7,60	27,7	16?	228,39	36,1	35,9	682,
33	9. VII.	7,25	27,2	15	227,47	35,7	36,3	674,

*) Diese Unsicherheit wurde dadurch verursacht, daß, wie sich erst nachträglich herauss

…).

…s Versuchs		Respiratorischer Quotient	Pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht			Energieumsatz pro 24 Stdn. und		Bemerkungen
	verbraucht		ausgegeben		verbraucht	1 kg Körpergewicht	1 qm Körperoberfl.	
…O_2	O_2		H_2O	CO_2	O_2			
…	g		g	g	g	kg-Cal	kg-Cal	
…56	2,701	0,742	51,47	39,03	38,25	126	823	
[illegible]	2,568	0,724	42,63	39,22	39,38	129	822	
…63	2,867	0,726	40,97	36,96	37,01	121	826	
[illegible]	3,165	0,746	41,14	38,06	37,09	122	850	
…59	3,005	0,740	42,39	37,19	36,54	120	850	
…47	3,487	0,740	48,94	43,83	43,09	142	995	22. XI. 0,076 g Hph subkutan
…06	2,780	0,761	44,39	39,70	37,95	125	847	
…61	2,393	0,748	36,91	35,60	34,61	114	794	
[illegible]	2,862	0,787	33,79	36,67	33,88	113	773	
…59	2,861	0,752	42,12	36,31	35,11	116	796	
…23	2,311	0,762	34,72	34,08	32,00	105	734	
…34	2,737	0,740	38,96	37,11	36,48	120	823	
…92	3,365	0,754	42,49	39,43	38,80	125	858	10. XI. abends 0,03 — 0,04 g *) Hph subkutan
…44	2,768	0,747	55,43	39,87	38,80	128	866	
…40	2,597	0,795	38,76	39,03	35,61	119	809	
…17	2,426	0,814	37,87	38,70	34,55	116	791	
…61	2,934	0,756	32,25	36,94	35,53	117	796	
[illegible]	2,369	0,770	35,66	37,59	35,49	117	805	
…28	2,396	0,737	32,42	33,09	32,66	107	720	
…31	2,418	0,761	39,57	37,27	35,61	118	797	
…87	2,479	0,788	36,84	43,00	39,67	132	905	13. II. abends 0,04 g Hph subkutan
…44	2,683	0,744	37,71	37,23	36,40	120	807	
…916	2,771	0,765	38,98	37,45	35,59	118	787	
…285	2,374	0,727	39,15	39,08	38,90	121	824	
…419	2,251	0,781	41,17	44,03	40,97	136	893	
…407	2,379	0,736	34,85	39,16	38,70	127	823	
…354	2,233	0,766	46,88	41,50	39,37	130	807	
…985	2,557	0,849	45,38	45,12	38,65	130	826	
…380	3,290	0,747	36,00	39,64	38,59	127	815	
…029	2,909	0,757	41,58	39,98	38,39	127	815	
…063	2,949	0,755	46,24	38,53	37,09	123	824	
…456	2,440	0,733	34,04	33,99	33,94	111	743	
…522	2,514	0,730	34,37	36,70	36,59	120	803	

…geblieben war, daher in die Spritze nicht hineingesaugt werden konnte.

Ge

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs Stunden	Mittlere Temperatur im Exsikkator °C	Dauer des Hungers Stunden	Mittleres Körpergewicht g	Körpertemperatur zu Beginn des Versuchs °C	Körpertemperatur am Ende des Versuchs °C	Gewi (ein zu Beg des Versu g
	1924							
1	25. VI.	7,500	28,0	17	190,35	35,5	35,9	644,3
2	6. VII.	7,000	27,7	17	183,82	36,3	36,2	648,8
3	3. VIII.	7,716	28,3	17	204,40	36,1	35,9	668,9
4	14. VIII.	9,266	28,0	14	204,70	34,6	35,7	689,8
5	14. IX.	6,883	27,6	16	230,27	36,5	?	713,4
6	24. IX.	7,666	27,6	16	217,46	36,9	36,4	660,8
7	29. IX.	7,550	28,0	17	210,48	35,9	36,2	654,2
8	5. X.	7,433	28,2	16	210,21	35,3	35,4	652,6
9	13. X.	7,666	28,0	16	212,02	35,9	35,8	671,7
10	19. X.	6,333	28,3	16	212,01	35,4	35,3	663,1
11	24. X.	7,733	28,0	15	211,49	34,7	35,9	662,8
12	29. X.	8,033	28,0	15	209,06	35,3	35,7	681,37
13	5. XI.	7,783	27,9	15	212,34	35,5	35,4	683,70
14	12. XI.	6,833	28,2	15	216,28	36,1	37,4	688,15
1	3. XII.	7,883	28,4	15	223,62	37,4	36,8	670,95
2	9. XII.	8,083	27,5	15	221,00	37,1	37,1	684,10
3	11. XII.	8,283	27,8	13,5	218,67	37,4	36,5	683,45
4	13. XII.	6,633	27,7	16	219,99	35,3	35,4	695,18
	1925							
1	18. III.	7,483	27,2	15	232,00	36,3	35,9	688,60
2	24. III.	8,500	28,0	15	231,54	35,4	35,9	686,57
3	30. III.	7,100	27,4	15	213,53	35,4	35,5	666,82
4	4. IV.	7,766	28,0	15	213,99	35,9	35,7	666,80
5	24. IV.	8,333	27,5	14	232,92	36,0	35,7	682,09
6	1. V.	8,216	28,0	15	228,22	35,7	35,4	675,68
7	6. V.	8,100	27,3	15	226,94	36,4	36,3	673,20
8	11. V.	8,883	28,2	14	223,78	36,4	35,7	690,05
9	17. V.	6,800	28,3	14	236,01	36,4	37,7	699,84
10	22. V.	10,363	28,0	13	207,35	34,9	36,4	667,20
11	6. VI.	11,000	28,0	14	210,96	36,6	36,9	668,48
12	24. VI.	7,685	27,8	16	214,29	36,7	36,0	668,74
13	10. VII.	8,133	27,7	15	213,70	34,7	35,3	660,05
14	18. VII.	8,000	28,6	16	211,62	35,4	36,3	663,05

*) Siehe die Fußnote bei Ratte F.

…ung).

…des Versuchs		Respiratorischer Quotient	Pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht			Energieumsatz pro 24 Stdn. und		Bemerkungen
			ausgegeben		verbraucht			
… CO_2	verbraucht O_2		H_2O	CO_2	O_2	1 kg Körpergewicht	1 qm Körperoberfl.	
… g	g		g	g	g	kg-Cal	kg-Cal	
[illegible]	2,260	0,741	40,63	38,71	37,99	125	789	
[illegible]	2,126	0,704	44,13	38,42	39,65	130	811	
[illegible]	2,483	0,719	42,71	37,37	37,78	123	798	
[illegible]	3,143	0,680	42,07	37,18	39,77	130	842	
[illegible]	2,541	0,767	47,41	40,58	38,48	127	857	
[illegible]	2,909	0,738	46,60	42,50	41,88	137	909	22. IX. 0,076 g Hph subkutan
[illegible]	2,476	0,767	46,56	39,46	37,39	124	809	
[illegible]	2,370	0,731	38,20	36,60	36,40	119	779	
[illegible]	2,463	0,736	39,40	36,84	36,37	119	782	
[illegible]	1,961	0,743	38,73	35,82	35,05	115	755	
2,493	2,455	0,739	37,16	36,58	36,03	118	775	
2,647	2,582	0,746	34,94	37,83	36,90	121	792	
2,598	2,541	0,743	38,38	37,73	36,90	121	795	11.XI. 0,05-0,06 g* Hph subkutan
2,886	2,717	0,773	49,87	46,87	44,12	146	963	
3,028	3,001	0,734	43,74	41,22	40,86	134	894	
3,032	2,951	0,747	41,50	40,74	39,65	130	867	
4,648	4,361	0,775	51,45	61,59	57,79	191	1266	
2,366	2,034	0,844	38,39	38,82	33,45	112	745	10. XII. nachm. 0,05 g Hph subk.
2,934	2,775	0,769	39,97	40,56	38,36	124	858	
3,285	3,099	0,771	44,56	40,06	37,79	125	845	
2,340	2,052	0,828	36,28	37,04	32,48	109	717	
3,070	2,653	0,841	47,41	44,34	38,31	129	846	
3,107	2,892	0,781	41,11	38,42	35,76	119	803	
2,879	2,799	0,748	37,37	36,85	35,82	118	792	
2,645	2,595	0,741	32,77	34,53	33,88	111	746	5. V. abends 1,5 ccm Na_2CO_3 subk. injiziert
3,163	3,062	0,751	43,57	38,19	36,97	122	813	
2,733	2,625	0,757	41,75	40,87	39,25	129	880	16. V. abends 0,08 g Hph subkutan
3,452	3,249	0,772	32,93	38,56	36,29	120	782	
3,606	3,273	0,801	42,88	37,29	33,85	113	739	
2,466	2,411	0,744	37,67	35,94	35,15	116	760	
2,557	2,481	0,732	36,23	35,31	34,26	112	738	
2,476	2,438	0,739	38,20	35,10	34,56	113	743	

Ge

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs	Mittlere Temperatur im Exsikkator	Dauer des Hungers	Mittleres Körpergewicht	Körpertemperatur		Gew (ein
						zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs	zu Be de Versu
		Stunden	°C	Stunden	g	°C	°C	g
	1925							
1	13. XI.	9,27	28,0	15	218,58	35,8	35,9	665,
2	17. XI.	6,37	28,0	18	219,08	35,3	35,4	664,
3	21. XI.	7,12	27,8	17	219,60	35,5	35,7	679,
4	3. XII.	6,52	27,5	17	223,54	35,8	36,3	676,
5	8. XII.	6,48	27,7	16	220,61	35,3	35,3	672,
6	15. XII.	7,18	28,0	17	219,31	35,3	35,6	670,
7	24. XII.	7,30	28,0	17	232,77	36,4	36,4	683,6
1	11. XI.	8,55	27,5	15	150,88	36,3	36,8	603,6
2	16. XI.	7,23	27,8	17	148,60	36,2	36,1	594,5
3	20. XI.	7,08	27,8	16	150,58	36,1	36,4	610,2
4	25. XI.	6,70	27,3	16	164,90	35,8	35,9	616,5
5	1. XII.	6,92	27,8	17	172,24	35,7	36,3	624,21
6	5. XII.	6,83	27,6	17	177,19	36,2	35,9	629,51
7	12. XII.	7,33	27,8	16	188,91	35,8	36,0	640,17
8	22. XII.	8,03	27,9	17	191,36	37,0	36,9	642,82
9	28. XII.	6,70	28,4	15	165,30	36,2	35,9	616,00
	1926							
10	3. I.	6,57	28,0	16	171,64	35,4	35,9	621,03

).

Versuchs		Respiratorischer Quotient	Pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht			Energieumsatz pro 24 Stdn. und		Bemerkungen
	verbraucht O_2		ausgegeben		verbraucht O_2	1 kg Körpergewicht	1 qm Körperoberfl.	
			H_2O	CO_2				
	g		g	g	g	kg-Cal	kg-Cal	
10	3,101	0,737	35,20	37,21	36,75	121	798	
2	2,001	0,742	36,12	35,14	34,41	113	750	
9	2,391	0,769	38,27	38,84	36,72	122	806	
7	2,248	0,769	35,93	39,16	37,04	123	818	
01	2,104	0,795	38,64	38,61	35,31	118	781	7. XII. 1,5 ccm 1 proz. Na_2CO_3 subkutan
41	2,369	0,749	34,55	37,19	36,09	119	788	
46	2,630	0,759	33,54	38,79	37,16	123	829	23. XII. vormittags 11 Uhr 0,06 g Hph subkutan
24	2,168	0,779	49,56	43,24	40,33	134	781	
28	1,788	0,703	44,43	38,59	39,92	131	760	
18	1,720	0,769	39,87	40,91	38,70	128	749	
15	1,869	0,745	36,80	41,60	40,60	134	805	
95	1,994	0,764	37,05	42,21	40,17	133	812	30. XI. abends 1,5 cm^3 Na_2CO_3 subkutan
69	1,919	0,784	38,06	41,01	38,04	126	780	
55	2,079	0,789	34,89	39,07	36,02	120	756	
75	2,736	0,738	46,70	43,32	42,72	140	887	21. XII. nachmittags 0,08 g Hph subkutan
32	2,061	0,752	48,30	46,20	44,66	147	888	
44	1,811	0,741	37,63	39,27	38,57	127	774	

Über die Ketonkörper des Blutes.

Von

Emerich v. Fazekas.

(Aus der II. internen Klinik der Budapester königl. ungar. Universitä

(Eingegangen am 22. Januar 1926.)

Es ist merkwürdig, daß, solange das verschiedene Verhalten c Blutzuckers unter gesunden und pathologischen Verhältnissen v recht zahlreichen Autoren geprüft wurde, die systematische Unt suchung des Ketonkörpergehalts im Blute vollständig vernachlässi blieb. Die Ursache mag auch der Mangel eines genügend genaue verläßlichen, leicht und rasch durchführbaren Verfahrens gewes sein, mittels welchen die Acetonkörper des Blutes bestimmt werdè konnten. Nur in der jüngsten Zeit wurden annehmbar gute Mikr methoden von *Engfeld* und später von *Lublin* veröffentlicht. Die Ve fahren sind aber noch in keinem ihrer Verwendbarkeit entsprechende Grade verbreitet.

Es entspricht nicht meinem Vorhaben, über diese zweierlei Method ein Urteil zu fällen, obzwar ich mit beiden vergleichende Experimen unternommen habe, es sei mir allerdings erlaubt, zu bemerken, daß bei nebst den Vorteilen ihre gewissen Nachteile besitzen, diese letzteren sir aber keinesfalls so beträchtlich, daß die Methode dabei unbrauchbar wär

Wir bestimmen nach *Engfeld* in dem venösen, nach *Lublin* in dem d Fingerspitze entnommenen Blute die Ketonkörper. Nach vergleichend Ausführung der beiden Verfahren hatte ich keinen wesentlichen Unterschi zwischen den Ergebnissen der beiden gefunden. Ich habe auch (mit gewiss Änderung) die β-Oxybuttersäure und das Aceton nach *Engfelds* Verfahre aus dem Kapillar-, nach *Lublins* Methode aus dem venösen Blute bestimm

Tabelle I.

Nr.	Blut	Aceton		β-Oxybuttersäure	
		nach *Engfeld*	nach *Lublin*	nach *Engfeld*	nach *Lublin*
1	kapillar	17,5	16,3	32,4	32,6
	venös	18,0	17,2	32,0	32,2
2	kapillar	23,0	23,5	34,3	34,0
	venös	22,0	23,3	34,4	34,2
3	kapillar	15,1	15,5	—	—
	venös	15,2	15,5	—	—

Wie aus Tabelle I ersichtlich, bestehen zwischen den Ergebnissen r beiden Methoden bloß so minimale Unterschiede, wie in den Grenzen r Versuchsfehler aufgefaßt werden können. Die Prüfungen beweisen so die Brauchbarkeit der beiden Bestimmungsmethoden, lassen auch ehen, daß zwischen dem Aceton- und β-Oxybuttersäuregehalt des pillaren und venösen Blutes kein Unterschied besteht, die Keton-rper verhalten sich dem Blutzucker vollständig analog.

Die Untersuchungen ließen aber zwischen Blutaceton und Blut-ker noch mehr Analogien merken. Wir wissen, daß der Grad der kosurie nicht mit dem Grade der Hyperglykämie in Beziehung t; es kann neben hohen Blutzuckerwerten eine verhältnismäßig ge Glykosurie bestehen und umgekehrt. Wenn wir die Keton-perwerte des Blutes und Harns vergleichen, sehen wir, daß zwischen den kein gesetzmäßiger Zusammenhang aufgestellt werden kann, Veränderung des einen wird nicht von entsprechender Veränderung anderen gefolgt. Es kann eine recht beträchtliche Acetonämie ben geringer Acetonurie bestehen, es ist durchaus nicht unmöglich, ß der Harn überhaupt kein Aceton enthält, richtiger, daß sich kein it dem jetzigen Verfahren nachweisbares Quantum darin befindet. chstehende, im Wege von Versuchen gewonnene Daten scheinen s zu bestätigen. Blutentnahme bei nüchternem Magen.

Tabelle II.

Nr.	Aceton		β-Oxybuttersäure	
	Blut mg-Proz.	Urin g-Proz.	Blut mg-Proz.	Urin g-Proz.
1	125	0,48	440	2,04
2	114	0,55	204	1,32
3	15	0,33	—	
4	18	0,25	—	
5	33	0,15	125	0,42
6	20	0,28		

Der Gegenstand meiner weiteren Untersuchungen war: Wie die Ketonkörper sich zwischen Blutkörper und Plasma aufteilen und ob daraus eine Schlußfolgerung gezogen werden kann, das betreffend, ob die Ketonkörper im freien Zustande oder gebunden im Kreislauf zirkulieren.

Ob die Blutkörper Zucker enthalten, ist bereits Gegenstand vieler Wortstreite und wurde bis heute noch nicht entschieden. Ein Teil der Forscher fand es nicht, dem anderen Teil gelang es, in den Blutkörperchen Zucker nachzuweisen, unter letzteren gab es wieder solche, die nur bei Diabetes und andere, die auch bei gesunden Menschen Glykose in den Blutkörperchen gefunden hatten. *Csáki* wollte unter diesen einander widersprechenden Ansichten Ordnung schaffen, indem er bewies, daß die

auf verschiedene Weise ausgeführten Untersuchungen die im Grunde v schiedenen Ergebnisse verursachen. Wenn wir gerinnungshemmende Sto dem Blute beifügen, werden die Blutkörperchen vielleicht in solcher Richtu beeinflußt, daß sie für den Zucker durchgängiger werden. Wahrhaft jene Gruppe der Forscher, die Zucker in den Blutkörperchen vorfand bedienten sich solcher Methoden, die eine Zugabe von gerinnungshemmend Stoffen erforderten. *Csáki* hat das Plasma durch promptes und rasch Zentrifugieren gewonnen und in diesem den Zucker bestimmt, auf diese We kam er zu jenem Ergebnis, daß die Blutkörperchen nur bei Diabetes melli Zucker enthalten.

Seine Methode habe ich auch in jenen Fällen verwendet, als ich meinen Prüfungen feststellen wollte, ob die Blutkörperchen auch Ket körper enthalten. Die Ergebnisse hingen davon ab, ob ich entweder na *Csáki* oder mit Zugabe von gerinnungshemmenden Materialien das Plas erhalten hatte.

Tabelle III.

Aceton	Gesamtblut	Plasma, zentrifugiert		Oxalat-Plasma		Verhältni zwischen Blutkörperch und Plasma
		Plasma	Blutkörperchen	Plasma	Blutkörperchen	
H. M.	125	145	34	130	44	63 : 37
V. M.	29	41	4	18	18	63 : 37
V. J.	15	26		12	8	59 : 41
β-Oxybuttersäure						
H. M.	440	560	88	432	168	
V. M.	48	63	9	32	28	
V. J.						

Wir sehen, daß bei Ausführung der Bestimmung in dem Plasm des Kaliumoxalatblutes ein recht beträchtlicher Teil des Acetons i den Blutkörperchen vorfindbar ist, demgegenüber gelangen wir nac Sedimentierung mittels Zentrifugation der Blutkörperchen zu einer vollständig entgegengesetzten Ergebnis. Die Blutkörperchen enthalte überhaupt keine oder nur in minimaler Quantität Aceton und β-Oxy buttersäure, dieses geringe Quantum kann nur im Falle von Com diabeticum erhöht sein.

Meiner Ansicht nach ist jenes Ergebnis, das wir mit solcher Plasma gewonnen haben, wo kein gerinnungsverhinderndes Mittel ange wendet wurde, eher annehmbar und besser, da mit diesem Verfahre annähernd jener Zustand erreichbar ist, in dem sich das Blut in de Gefäßen befindet, nach Zugabe von verschiedenen Chemikalien is es nicht unmöglich, daß wir die Permeabilität der Blutkörperche veränderten, dies wieder kann zu verschiedenen Ergebnissen führen Es ist wahrscheinlicher, daß die Blutkörperchen in minimalem Maß Ketonkörper enthalten, dieser Gehalt würde durch die Acetonämi erhöht werden. Wie die ungleiche Verteilung der Ketonkörpe zwischen Plasma und Blutkörperchen begründet werden kann, o 1. die Ketonkörper in gebundenem und (bei Coma) in freiem Zustand

ı Blute vorkommen, oder ob 2. die Blutkörperchen nur in kleinem laße für die Ketonkörper durchgängig sind — diese Durchgängigkeit ll sich aber bei Coma und unter dem Einfluß verschiedener chemischer ittel verstärken — konnte bisher noch nicht entschieden werden. Es t unsere Erfahrung interessant, daß nach Einspritzen von Insulin ı erster Reihe das Blutaceton verschwindet bzw. abnimmt, dies wurde ach den Blutzucker betreffend festgestellt. Die Wirkung des Insulins cheint die erste Annahme zu bestätigen, es kann angenommen werden, aß das Hormon des Pankreas in erster Reihe das in den Blutkörper ndringende Aceton und den Zucker angreift.

Es war noch unsere Wahrnehmung interessant, daß *bei Coma abeticum* nach der Injektion des Insulins *ein recht beträchtlicher Abfall er β-Oxybuttersäure erfolgte, und zwar schon dann, als wir weder im utzucker noch im Blutaceton eine Änderung wahrnehmen konnten.* ne Coma nach der Insulininjektion wurde kein so großer Abfall der Oxybuttersäure beobachtet, sie veränderte sich hier im großen ganzen it dem Aceton proportional.

	Vor der Injektion			Insulin-Einheiten	Nach der Injektion		
	Aceton	β-Oxy-buttersäure	Blutzucker		Aceton	β-Oxy-buttersäure	Blutzucker
H. M.	125	440	0,45	40	115	204	0,41
H. M.	40	540	0,54	40	23	200	0,52
X. J.	75	235	0,38	60	52	104	0,36
V. M.	33	125	0,48	{70 + 30}	45	75	0,21

Das beträchtliche Sinken der β-Oxybuttersäure — auch schon dann, ls der Blutzuckerwert noch unverändert blieb — kann in jedem Falle ls charakteristisch erachtet werden, mit Ausnahme des letzten Falles, o der Patientin 30 Einheiten Insulin auch intravenös verabreicht urden, das Fallen des Blutzuckers in diesem Falle kann auch diesem Umstand zugeschrieben werden.

Im ersten und dritten Falle erhielt der Kranke zwischen der ersten nd zweiten Blutentnahme bloß das Insulin, im zweiten und vierten Falle urde auch inzwischen $NaHCO_3$ und Zuckerlösung intravenös verabreicht. Diese hatten aber, wie wir sahen, nichts an dem Resultate geändert. — Der Blutzucker wurde halbstündlich mit der von mir modifizierten *Hagedorn*-chen Methode bestimmt.

Es trat in den Fällen 1 und 2 — ohne Darreichung von Zucker oder Soda — Besserung ein, das Coma wurde von Schläfrigkeit und Mattigkeit bgelöst, das Kußmaulatmen hörte auf. Im Blute läßt sich *eine* Änderung ahrnehmen, nämlich die der β-Oxybuttersäure, dieser beträchtliche Fall steht aber im Gegensatz zu dem kaum oder nur in geringem Maße inkenden Blutzucker. Es ist auffallend, daß das Aufhören des Comas

nur von großem Sinken des β-Oxybuttersäurewertes gefolgt wird. I
weitere Verlauf ist dann den schweren Acidosen ähnlich, Blutzuck
Aceton und β-Oxybuttersäure nehmen nach erneuten Insuline
spritzungen proportional ab.

Jene Erfahrungen, daß die Symptome der Säurevergiftung ol
Zufuhr von Alkali, allein nach der Insulininjektion, also nach stark
Abnahme der β-Oxybuttersäure verschwanden, scheinen *Noord*
Theorie zu unterstützen. Das Insulin verhalf zur Verbrennung
β-Oxybuttersäure, aus der die minder giftige Acetessigsäure u
Aceton entstanden.

Wir sehen also in den ersten Stunden deshalb kein beträchtlich
Sinken des Acetonwertes, weil dieses, wenn es auch verbrannte, infol
der Wirkung des Insulins entstand, noch mehr aus der β-Oxybutt
säure, und demzufolge kann sogar der Acetonwert steigen, wie d
unser Fall 4 beobachten ließ.

Das Insulin beeinflußt also nach diesem nicht nur den Blutzuck
spezifisch, sondern auch die Ketonkörper, was auch schon *Noord*
wahrgenommen hatte: „Öfters schien uns das Insulin . . . relativ stärk
auf die Acetonurie als auf die Glykosurie einzuwirken".

Die Untersuchungen haben aber noch sonstige Wirkungen d
Insulins aufgeklärt. Wir wissen, daß das Hormon des Pankreas d
Alkalität des Blutes steigert, auf die $Na^{\cdot}$- und $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionenkonzentratio
des Blutes einwirkt. Auf Grund dieses können wir annehmen: „Da
Insulin beeinflußt die allgemeinsten biologischen, chemisch-physik
lischen Vorgänge" (*Villa*).

Die Wirkung des Insulins auf die Ketonkörper kann eine direk
oder indirekte sein, d. h. durch Steigerung der Zuckerverbrennung
„im Feuer der Kohlehydrate können die Ketonkörper bzw. Fet
vollkommener verbrennen". Es ist aber auch nicht unmöglich, daß
neben der Einwirkung auf die Kohlehydrate auch direkt zur Oxydatio
der Ketonkörper verhilft. Neben dieser Anschauung würde jener Fa
sprechen, daß bei bestehendem hypophysären Diabetes mellitus nac
der Insulininjektion sich der Blutzucker überhaupt nicht verändert
die Ketonkörper aber nahmen folgendermaßen ab:

I.	Blutzucker	0,52 Proz.
	Blutaceton	48 mg-Proz.
	Blut-β-oxybuttersäure	156 „

Von früh 8 Uhr bis abends 7 Uhr wurden 200 Einheiten Insulin „Lilly
verabreicht.

Nun fanden wir:

II.	Blutzucker	0,47 Proz.
	Blutaceton	96 mg-Proz.
	Blut-β-oxybuttersäure	25 „

Das Ergebnis stimmte also auch hier mit den Ergebnissen bei nkreatogenem Coma diab. überein. *In erster Reihe nimmt die β-Oxy-ttersäure ab, später auch das Aceton, der Blutzucker aber blieb sozusagen rerändert, das für die direkt auf die Ketonkörper ausgeübte Wirkung s Insulins zu sprechen scheint.* Bei der Sektion wurden in diesem alle die Pankreas- und *Langerhans*-Inseln für gesund befunden, es stand aber bei dem Patienten ein nußgroßes Hypophysisadenom. s konnte also angenommen werden, daß wir einem Diabetes hypophy-en Ursprungs gegenüberstanden. Das Insulin hat aber doch die Keton-körper des Blutes, ähnlich wie bei dem Pankreasdiabetes, herabgesetzt. Wenn wir diese Ergebnisse in Betracht ziehen, kann die direkt auf die Ketonkörper ausgeübte Wirkung des Insulins angenommen werden.

Literatur.

Lublin, diese Zeitschr. **188**, 633, 1925. — *Csáki*, Wiener Arch. f. inn. Med. **8**, 459. — *Pincussen*, Mikromethodik. Leipzig.

Über die Wirkung der Kationen der Ringerlösung auf die glatte Muskulatur des Meerschweinchenuterus[1]).

Von

M. Kochmann.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Halle-Wittenber

(Eingegangen am 28. Januar 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Unter dem gleichen Titel habe ich in dieser Zeitschrift, **161**, 39 1925, Versuche von ***Friedrich Holub*** mitgeteilt, die durch weitere Unte suchungen ergänzt worden waren. In dieser Arbeit war als wesent lichstes Ergebnis betont worden, daß man durch Änderung *eines* Kation der Ringerlösung notwendigerweise auch den Gehalt an den beide anderen Kationen ändere, so daß man, wie es immer noch oft behaupte worden ist, nicht ein Kation vermindern kann, ohne auch die Wirksan keit der anderen zu beeinflussen. Und weiterhin wurde betont, daß e nicht allein auf den Gehalt an Kalium- und Calciumionen und ih absolute Menge ankomme, sondern daß auch das Natriumion eine seh wesentliche Rolle spielt. Diese Beobachtungen wurden zum größte Teile in isotonischen Lösungen angestellt, und wo von der Isotoni abgewichen wurde, war das mit Absicht geschehen.

Diese Versuchsergebnisse stellte ich Herrn Kollegen *Loewe* i Dorpat schon vor der Drucklegung auf seine Bitte hin zur Verfügun nachdem er mir mitgeteilt hatte, daß er ein besonderes Schema fü derartige Versuche ausgearbeitet habe, das ihm sehr gute Dienst geleistet hätte. Er übersandte mir auch gleichzeitig dieses Schema das er dann in dieser Zeitschrift **167**, 92, 1926 veröffentlicht ha Dieses Schema erscheint mir in der Tat als ein außerordentlich große Fortschritt bei der Lösung des Problems der Ionenwirkung, und s

[1]) Die Versuche, die schon vor geraumer Zeit begonnen wurden konnten dank der Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutsche Wissenschaft zum Abschluß gebracht werden. Es sei an dieser Stelle de Dank für die Hilfe und Förderung ausgesprochen.

sich Herr *Loewe* auf meine Arbeiten stützte, so habe ich meinerseits dreiachsige Koordinatensystem übernommen, um meine Versuche h weiter zu vervollständigen.

In diesem dreiachsigen Koordinatensystem werden in den drei ken *A*, *B* und *C* die Mengen an Natrium-, Kalium- und Calcium- orid eingetragen, die sich ergeben würden, wenn jedes der drei Salze Isotonie allein zu bestreiten hätte, und zwar wird die absolute nge = 100 gesetzt. Die Seiten des gleichschenkligen Dreiecks sind Abszissen des Koordinatensystems. *AC* ist die Abszisse des Natriums, B die des Kaliums und *BC* die des Calciums. Die in *A*, *B* und *C*

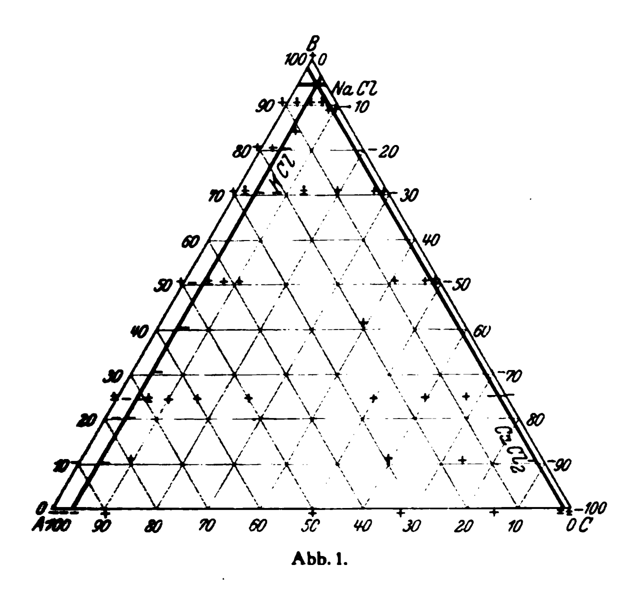


Abb. 1.

richteten Senkrechten sind die Ordinaten, und zwar ist die in *A* richtete die Natrium-, die in *B* die Kalium- und die in *C* die Calcium- rdinate. Der normale Gehalt der Kationen ist durch die Natrium-, alium- und Calciumlinie bezeichnet, die sich in einem Punkte schneiden, en *Loewe* sehr glücklich mit Eukrasiepunkt bezeichnet hat. Es ist lso derjenige, in dem die Mischungsverhältnisse der drei Kationen der rmalen Ringerlösung entsprechen. Nun kann man mit Hilfe dieses chemas die drei Kationen beliebig miteinander mischen, ohne die sotonie zu verletzen, indem man sich irgend einen Punkt heraussucht nd in dem dreiachsigen Koordinatensystem die Konzentrationen abliest.

Alle diese Punkte bezeichnen Mischungen der drei Kationen, die von dem normalen Gehalt abweichen und die *Loewe* als Dyskrasie-

punkte bezeichnet. Die Verbindungslinie der Ecken mit dem Eukras
punkt und ihre Verlängerung über den Eukrasiepunkt hinaus umfa
diejenigen Punkte, bei denen das Verhältnis zweier Ionen ebenso gr
ist wie in der Ringerlösung. *Loewe* bezeichnet die Verbindung die
Punkte als Eukrasielinien und hält ihre besondere Bedeutung f
möglich. Wir werden sehen, daß diese Vermutung, die, natürlich
anderer Form, auch von anderern Autoren ausgesprochen worden i
nicht zutrifft.

In der vorliegenden Mitteilung sind die Versuche meiner erst
Veröffentlichung verwertet und noch wesentlich ergänzt. Es ist zunäch
die Änderung der Tätigkeit[1]) der Uterusmuskulatur des Meerschwei
chens berücksichtigt worden. Eine Steigerung ist in dem System m
einem +, eine Mittellage mit einem $\pm$, eine Senkung mit einem -
keine Veränderung mit 0 bezeichnet worden. Sind die Einzelkon
traktionen erhalten, so tragen die Zeichen eine knopfartige Verdickung $\dot{+}$
$\dot{\pm}$, $-\bullet$. Es lassen sich aus diesem Schema mit einem Blick die Ver
suchsergebnisse ablesen.

Man erkennt folgendes:

Sind sämtliche Kationen der Ringerlösung durch Natriumchlori
ersetzt, so steigt die Tätigkeit der Uterusmuskulatur an. Sind sämtlich
Kationen durch Kaliumchlorid ersetzt, so fällt die Tätigkeit ab. Be
alleiniger Anwesenheit von Calciumchlorid sinkt der Tonus gleichfalls.

Befindet sich in der Lösung nur Natrium und Kalium und fehlt
das Calciumion, so ist, wie die Zeichen auf der Linie *BC* zeigen, de
Kontraktionszustand immer vermindert oder aufgehoben, dabei ist
es gleichgültig, in welchem Mischungsverhältnis Kalium und Natrium
vorhanden sind.

Bei weiteren Betrachtungen empfiehlt es sich, die Linie des
normalen Kalium- und Calciumionengehalts zu verfolgen. Steigen
wir von dem Fußpunkt der Calciumlinie empor, so haben wir im unteren
Teile bei hohem Kalium- und geringem Natriumgehalt Mittellage oder

[1]) Die Tätigkeit des Uterus umfaßt selbstverständlich eine Reihe von Faktoren, Tonus, Kontraktilität der Muskulatur, Rhythmus, Kontraktionsgröße, Frequenz der Bewegungen. Es ist hier hauptsächlich der Kontraktionszustand berücksichtigt worden, gleichgültig, ob Bewegungen oder keine Einzelkontraktionen vorhanden sind. Ich verstehe unter diesem Kontraktionszustand letzten Endes ein Mittel aus beinahe allen Faktoren, etwa dem *mittleren* Blutdruck vergleichbar, den man bei der Blutmessung dadurch aufschreiben lassen kann, daß man die Verbindung zwischen Manometer und Arterie möglichst weit abdrosselt. Ich bin mir wohl bewußt, daß bei dieser Betrachtungsweise ein gewisser subjektiver Faktor eingeschaltet wird, der aber doch wohl in Kauf genommen werden kann, wenn die nötige Erfahrung und die hinreichende Zahl von Versuchen vorliegt.

Abnahme der Tätigkeit, weiter oben bis zum Eukrasiepunkt starke Steigerung oder sogar Kontraktur.

Denken wir uns eine Linie, die die Hälfte des normalen Calciumgehalts bezeichnet und in der Mitte zwischen Linie BC und der Calciumlinie liegt, so ist auch hier der Kontraktionszustand im unteren Teile erniedrigt, bei 50 Proz. des KCl-Gehalts zeigt der Uterus eine Mittelstellung und darüber hinaus bis nahe an die NaCl-Linie ist der Kontraktionszustand vermehrt.

Bei weiterer Steigerung des Calciumgehalts über die Norm hinaus, wird der Kontraktionszustand immer erhöht, wobei es fast gleichgültig ist, in welchen Mischungsverhältnissen die drei Ionen vorhanden sind, wenn nur mehr als normale Kaliummengen in der Mischung enthalten sind.

In der Nähe und unterhalb des normalen Kaliumgehalts ändern sich die Verhältnisse noch charakteristischer. Am Fußpunkt der Abszisse AB und der normalen Kaliumlinie ist der Kontraktionszustand stark erniedrigt. Wenn man auf dieser letzteren Linie in die Höhe steigt, so liegt bei 95 Proz. NaCl ein Umschlagspunkt für die Uterustätigkeit, die jenseits davon eine Steigerung erfährt. Auf der Abszisse AB, also bei Kaliumfreiheit der Lösungen, befindet sich ein ähnlicher Umschlagspunkt schon bei etwa 25 Proz. des normalen NaCl-Gehalts. Auf der Linie, die der Hälfte des normalen Kaliumgehalts entsprechen würde und in der Mitte zwischen AB und der KCl-Linie liegt, findet sich der Umschlagspunkt bei etwa 60 bis 70 Proz. NaCl.

Wenn der Kaliumgehalt nur ganz wenig über das normale Maß gesteigert ist, so bleiben die Verhältnisse ähnlich denen auf der normalen Kaliumlinie; jenseits der KCl-Linie ist Tonussteigerung und Kontraktur zu beobachten.

Man erkennt aus diesen Ergebnissen auffällig deutlich den Einfluß des Natrium-, Kalium- und Calciumions, von denen man nicht sagen kann, ob das eine oder andere in negativem oder positivem Sinne wirkt. Sie wirken alle drei zusammen und miteinander.

Die Einzelkontraktionen des Uterus sind im allgemeinen nur in gewisser Nähe des Eukrasiepunktes erhalten. Dem Anschein nach sind die Einzelkontraktionen der glatten Muskulatur an einen hohen Gehalt an NaCl gebunden.

Bemerkenswert ist auch eine Verfolgung der verschiedenen Natriumlinien, beispielsweise der Linie, welche 10 Proz. NaCl anzeigt. Die Tätigkeit des Uterus steigt von einem Nullpunkt, der bei Kaliumfreiheit liegt, bis zur Kontraktur, um an der normalen Calciumlinie wieder abzusinken und den tiefsten Stand bei Calciumfreiheit zu erreichen. Bei 25 Proz. NaCl-Gehalt ist bei Kaliumfreiheit eine Mittel-

lage vorhanden, bei Zunahme des Kaliumgehalts bis etwa zur Norm wird der Kontraktionszustand vermindert und geht dann schließlich über eine Mittellage zur Steigerung und Kontraktur über, die in der Nähe des normalen Calciumgehalts wieder absinkt und bei Calciumfreiheit wiederum einen Nullpunkt erreicht.

Bei der Linie von 70 Proz. NaCl beobachtet man bei Kaliumfreiheit zunächst Steigerung, dann Mittellage, dann Absinken und wiederum Ansteigen bis zu einer starken Steigerung, die bei Calciumfreiheit wiederum einem Abfall Platz macht.

Eine besondere Besprechung erfordern die Mischungen, die in der Nähe des Eukrasiepunktes gelegen sind und für die die zweite Abbildung als Anhalt dienen mag. Sie zeigen recht verschiedene Wirkungserfolge, die schon zum Teil durch frühere Untersuchungen hinreichend

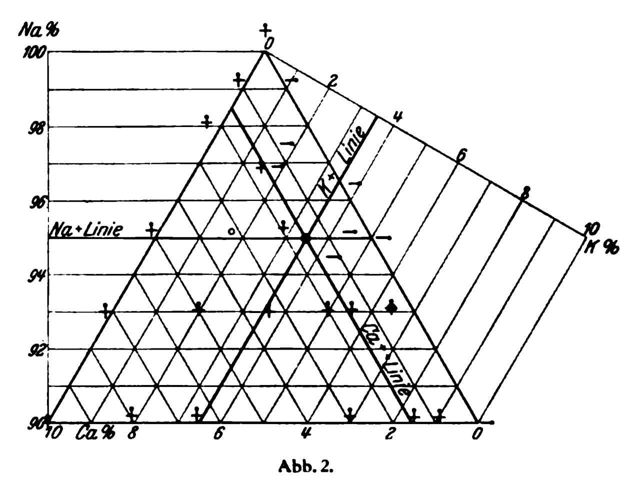


Abb. 2.

bekannt sind. Die Mischungspunkte in einem Trapez, das von *AB*, *BC* und den normalen NaCl- und $CaCl_2$-Linien umgrenzt ist, zeigen die Tätigkeit des Uterus vermindert, indem die Einzelkontraktionen weniger hoch sind als bei normaler Ringerlösung. Außerhalb dieses Trapezes ist entweder keine Veränderung oder meistens eine Steigerung des Kontraktionszustandes festzustellen.

Die neuen Tatsachen, die sich aus diesen Versuchen ergeben, finden sich vor allem auf dem Teile des Diagramms, der zwischen Kaliabszisse — und Linie gelegen ist, und in dem sich beim Anstieg des Natriumchlorids der Einfluß der Na-Ionen im positiven Sinne offenbar stark geltend macht. Ähnliches zeigt sich, wenn auch in etwas geringerem Maße, in dem Abschnitt zwischen Calciumabszisse und Calciumlinie. Dabei ist bemerkenswert, daß im ersten Falle der Kaliumgehalt, im zweiten der Calciumgehalt gleich bleiben.

Ferner ist es außerordentlich bemerkenswert, wie gering die Kon-
ntrationsunterschiede sind, die unter Umständen die Wirkung in
as Gegenteil umschlagen lassen. Man betrachte zu diesem Zwecke die
atriumlinie bei 25, 50 und 70 Proz.

Aus dem Diagramm ist weiterhin ersichtlich, daß die Linien, die
en normalen Ionengehalt bezeichnen, also die Natrium-, Kalium-
nd Calciumlinie, von der größten Bedeutung sind. Diesseits und
nseits sind Umschlagspunkte vorhanden. Dagegen zeigt sich, daß
ie Eukrasielinien, von denen *Loewe* größere Bedeutung vermutete,
eine Besonderheiten erkennen lassen.

Es sind in den vorliegenden Versuchsergebnissen durch so zahl-
iche Stichproben die Wirkungen einzelner Mischungsverhältnisse
er Natrium-, Kalium- und Calciumionen festgestellt, daß die Be-
auptung berechtigt ist, daß alle nur irgend möglichen Mischungs-
rhältnisse dieser drei Ionen bei Isotonie der Salzkonzentration für
en Meerschweinchenuterus nunmehr bekannt sind.

Weitere Untersuchungen, einige von meinen Assistenten Dr. *Wagner*
nd Dr. *Hessel*, mit anderen Organen, manche auch unter Arznei-
nittelwirkung, sind bereits im Gange und teilweise schon ab-
eschlossen. Sie sollen in Kürze veröffentlicht werden.

Beiträge zur Physiologie des Höhenklimas.

I. Mitteilung:

Wirkung des verminderten Luftdrucks auf p_H und CO_2-Bindungsvermögen des Blutes.

Von

G. Fritz (Budapest).

(Aus dem Schweizerischen Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos.)

(Eingegangen am 29. Januar 1926.)

(Mit 3 Abbildungen im Text.)

Die Wirkungen des Klimawechsels auf die lebenden Organismen und hauptsächlich die des Höhenklimas sind allbekannt. Es ist schon eine alte Beobachtung, daß der Aufenthalt in großen Höhen besondere, individuell geringere oder stärkere, bei etlichen Personen aber sehr ernste Symptome hervorruft, welche man zusammenfassend als Bergkrankheit bezeichnet. Es ist demnach selbstverständlich, daß diese auffallenden Erscheinungen, nachdem sie das allgemeine Interesse auf sich richteten, die wissenschaftliche Forschung veranlaßten, die jene Symptome verursachenden klimatischen Faktoren und die durch das Klima bedingten physiologischen Veränderungen zu klären.

Ohne Zweifel ist unter den klimatischen Faktoren der verminderte Luftdruck der wichtigste. Das auf 760 mm eingestellte physiologische Gleichgewicht muß in jedem Falle gestört werden, wenn der Organismus während eines Aufstiegs unter einen um 100 bis 200 oder noch mehr Millimeter Hg verminderten Luftdruck gelangt. Unter den Faktoren des physiologischen Gleichgewichts wird an denen am leichtesten eine Veränderung zu konstatieren sein, welche von Luftverdünnungen am meisten abhängig sind, diese sind: Gaswechsel, Blutchemie und Stoffwechsel. Nach den grundlegenden Arbeiten von *P. Bert*, *Mosso*, *Korányi*, *Abderhalden* und *Zuntz*, aber hauptsächlich nach den Untersuchungen von *A. Loewy* sind schon die meisten aufgetauchten Fragen beleuchtet.

Am bedeutendsten unter den Faktoren der Wirkungen des Höhenklimas ist jedenfalls die Luftverminderung bzw. der durch die Verminderung der O_2-Tension verursachte Mangel der Organe an Sauer-

stoff. Jene Folgen, die aus dem Sauerstoffmangel der Zellen sich entwickeln, können wir uns auf zweierlei Weise vorstellen. Die erste, und das wäre die handgreiflichere: daß die Zellen wegen der verminderten Sauerstoffzufuhr an ihrer oxydativen Energie verlieren, womit ein erhöhter Zerfall von Eiweiß und ein abnormes Steigen der Produktion von organischen Säuren verbunden wäre. In diesem Falle muß also der intermediäre Stoffwechsel gegen eine acidotische Richtung hin sich verschieben. Die anderen vorstellbaren Folgen des Sauerstoffmangels der Organe wären, daß der Organismus diesen Mangel zu kompensieren bestrebt ist, was er mit einer Erhöhung der Atmung versucht. In diesem Falle wäre keine Veränderung in dem intermediären Stoffwechsel zu beobachten, ja bei einer Überkompensation, denn auch das könnte man sich vorstellen, müßte infolge der gesteigerten Ausscheidung von CO_2 der intermediäre Stoffwechsel, besser gesagt die p_H des Blutes, gegen eine alkalische Richtung hin sich verschieben. Daß dieser Vorgang im Blute infolge Hyperventilation gut beweisbar ist, haben wir in einer gemeinsamen Arbeit mit *Duzár* gezeigt (1).

In der jetzigen Arbeit habe ich mir als Ziel das Klarlegen dieser Frage vorgelegt, da darüber weder pro noch contra eine abgeschlossene Meinung besteht.

Zur Entscheidung der Frage habe ich die *Veränderungen des p_H und das CO_2-Bindungsvermögen des Blutes unter vermindertem Luftdruck* beobachtet. Bei der Untersuchung des CO_2-Bindungsvermögens des Blutes bin ich der durch *van Slyke* angegebenen Methode gefolgt, doch mit einigen Veränderungen. Von der ursprünglichen Vorschrift, welche die Sättigung des Plasmas mit CO_2 durch dessen Schütteln mit Exspirationsluft vorschlägt, bin ich insofern abgewichen, daß ich das Plasma immer mit einem 6 Proz. Kohlensäure enthaltenden, nach Sättigung des Plasmas genau analysierten Gasgemisch geschüttelt habe. Um die p_H des Blutes zu bestimmen, besitzen wir zwei Möglichkeiten: eine bei der man auf direkte Weise, und die andere, bei der man durch Berechnung der aktuellen Reaktion nach der Formel von *Hasselbalch* das p_H bestimmt. Ich habe bei meinen Untersuchungen die direkte Messung gebraucht und meine Bestimmungen mit Hilfe der *Holló-Weiss*schen Methode (2) ausgeführt. An diesem Orte kann ich mich mit jener kolorimetrischen Methode nicht länger befassen, doch muß ich erwähnen, daß ich sie sehr exakt gefunden habe.

Meine Untersuchungen habe ich in dem Davoser Forschungsinstitut für Hochgebirgsphysiologie durchgeführt mit Anweisungen des Herrn Prof. *A. Loewy*, für dessen liebenswürdige Hilfe ich auch hier meinen besten Dank aussprechen möchte.

Meine Experimente habe ich hauptsächlich an Kaninchen ausgeführt, doch auch aus gewissen Gründen an Katzen. Die Blutentnahme

geschah stets aus der V. jugularis mit gewissenhaftester Vermeidun jeder Stauung. Bei der Blutentnahme zum p_H habe ich stets strengsten auf die luftdichte Entnahme geachtet.

I. Verminderung des Luftdrucks auf natürlichem Wege.

Diesen Teil meiner Versuche habe ich teils in Budapest, teils in Davo vollbracht. Ich wünschte jene etwaigen Veränderungen zu beobachten welche sich an den Experimentierobjekten infolge dieser nicht große Luftveränderung entwickeln. Nachdem die Daten der zehn Tiere in Buda pest ermittelt waren, sandte ich sie als Eilgut nach Davos, wo sie 3 Tag nach ihrer Ankunft unter einen Kontrollversuch kamen. Die Tiere habe den ziemlich langen Weg binnen 24 Stunden zurückgelegt und sind i voller Gesundheit eingetroffen. Die ganze Zeit lang wurden sie auf ge mischter grüner Kost gehalten, um die durch Haferfütterung verursacht und zweifellos eintretende Änderung des Blutes zu vermeiden. Die Höhen differenz zwischen den zwei Orten ist 1500 m, welcher Wert durchschnittlic 120 mm Luftdruckverminderung entspricht. In dem Benehmen und der Appetit der Tiere war kein Unterschied zu beobachten. Die Unterschied in der p_H des Blutes und im Sauerstoffbindungsvermögen sind in de folgenden Tabelle angegeben.

Budapest				Davos			
Nr.	p_H	CO_2-Tens.	100 ccm Plasma binden CO_2	Nr.	p_H	CO_2-Tens.	100 ccm Plasma binden CO_2
1	7,56	45,6	37,1	1	7,40	37,2	32,3
2	7,60	45,3	38,1	2	7,56	37,2	38,1
3	7,46	45,5	43,9	3	7,32	37,7	36,1
4	7,57	44,8	35,2	4	7,29	36,8	28,4
5	7,58	45,2	34,2	5	7,38	36,5	32,3
6	7,50	44,7	43,9	6	7,36	37,3	35,2
7	7,45	45,3	33,2	7	7,26	37,1	34,9
8	7,52	45,5	35,2	8	7,30	36,6	34,2
9	7,57	45,5	37,1	9	7,46	37,5	32,1
10	7,45	43,2	38,1	10	7,28	37,5	32,4
Mittel	7,52	45,06	37,6	Mittel	7,40	37,1	33,6

Aus diesen in der Tabelle angegebenen Werten ist zu entnehmen, daß nur das p_H des Blutes eine bedeutende Veränderung erfährt, und zwar verschiebt es sich gegen eine acidotische Richtung hin. Aus der Veränderung des CO_2-Bindungsvermögens des Blutes kann man in diesem Falle, da auch die Kohlensäuretension sich proportional verminderte, für die Niveaudifferenz von 1500 m keinen Schluß ziehen, weil die gewonnenen Unterschiede denen der verminderten CO_2-Tensionen beiläufig entsprechen.

Um die Unterschiede leichter zu überblicken, sind sie graphisch dargestellt. Unten auf der Tafel ist die Kohlensäuretension in Millimetern, links das CO_2-Bindungsvermögen des Blutes in Kubikzentimetern, rechts aber die Werte des p_H aufgezeichnet. Im Innern der Vierecke befinden sich die Werte des Kohlensäurebindungsvermögens des Blutes. Die die Vierecke durchschneidenden Linien ergeben den durchschnittlichen Wert des CO_2-Bindungsvermögens und des p_H.

Gut zu beobachten ist auf der Abb. 1, daß die Veränderung des CO_2-Bindungsvermögens mit der Senkung der CO_2-Tension zusammenhängt, da die zwei Vierecke in einem Ausstrahlungspunkt kulminieren. Die Verschiebung des p_H des Blutes zeigt aber auch hier schon eine Abnahme gegen die acidotische Richtung, wenn wir die Resultate auf Kaninchen

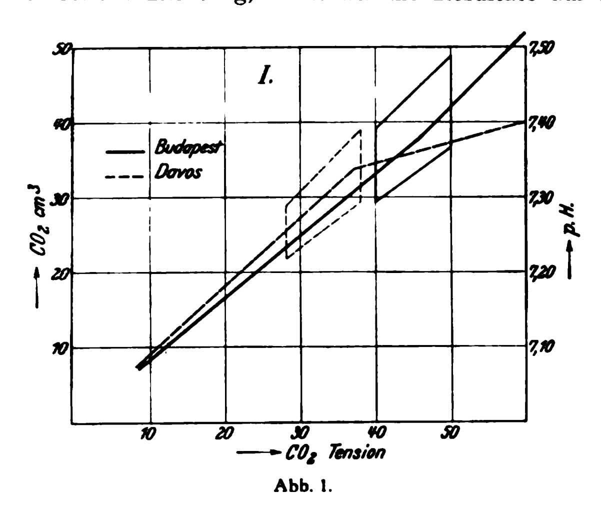


Abb. 1.

ansehen. Bei Kaninchen liegt nämlich das p_H des Blutes bei 7,50. Der Grund dafür, daß die Ergebnisse des CO_2-Bindungsvermögens der zwei Beobachtungsdaten einander nahe stehen, glauben wir darin zu finden, daß zwischen der Ankunft und Aufarbeitung der Tiere 3 Tage lagen, während welcher Zeit die Tiere sich schon einigermaßen akkomodieren konnten. Die Verschiebung in den Werten des p_H, welche eine ausgesprochene ist, brachte mich darauf, daß ich meine Untersuchungen mittels artifizieller Luftdruckverminderung mit Zuhilfenahme einer pneumatischen Kammer fortsetzte.

II. Artifizielle Luftdruckveränderung.

Diese Versuche habe ich mit einer dem Davoser Institut angehörigen, zu Tierversuchen eingerichteten pneumatischen Kammer durchgeführt, in der die Tiere auf die gewünschte Luftdruckverminderung zu bringen waren. Die Zusammenstellung und das Prinzip des Apparates finden wir durch *Laubender* (3) beschrieben, so daß ich an diesem Orte auf eine Beschreibung verzichte. Die Luftverdünnungen entsprachen, gemäß den an den Tieren gefundenen schweren Symptomen, 250 bis 320 mm, bezogen auf Davoser Luftdruck. Der absolute Druck unter dem die Tiere sich befanden, entsprach demnach 380 bis 310 mm, welcher 5500 bis 7000 m Berghöhe entspricht, auf eine solche Weise erzielten wir nun ziemlich große Niveaudifferenzen.

Die Tiere hielten sich wenigstens 12 Stunden in der verdünnten Luft auf. Die Kaninchen ertrugen die Luftverdünnung durchschnittlich gut, wenn wir die Luftverdünnung langsam vollbrachten. Bei einer Verdünnung von über 200 mm konnten wir an jedem Tiere Müdigkeit, Schlafsucht, dann eine sich langsam einstellende Dyspnoe beobachten. Nach dem 12-

bis 24stündigen Aufenthalt in verdünnter Luft haben wir die Tiere na einer langsamen Druckerhöhung aus der Kammer befreit und von ihn schon vorher herauspräparierten V. jugularis sofort Blutproben genomme

Bei diesen Versuchen benutzte ich auch ebenso wie bei den vorige die Methode von *van Slyke* bzw. von *Holló-Weiss*. Das Sättigen des Plasm geschah mit einem kontrollierten 6proz. CO_2-Gemisch. Auf eine solcl Weise hoffte ich auch außer dem Wechsel des p_H noch das Wechseln d CO_2-Bindungsvermögens messen zu können, da ich fast ausschließlich m gleicher CO_2-Tension arbeitete. Die Resultate sind die folgenden:

Normal				Artifizielle Luftverdünnung				
Nr.	p_H	CO_2-Tens.	CO_2-Bindungs-vermögen	Nr.	p_H	Grad der Verdünnung mm	CO_2-Tens.	CO_2-Bindungs-vermögen
1	7,24	36,5	28,4	1	7,16	250	36,4	15,9
2	7,56	36,5	36,1	2	7,46	230	36,8	34,2
3	7,38	37,4	32,3	3	7,26	230	37,1	17,8
4	7,46	36,9	30,3	4	7,35	320	37,2	22,6
5	7,36	37,2	35,2	5	7,24	270	37,2	30,3
Mittel	7,40	36,9	32,4	Mittel	7,29	270	36,9	24,0

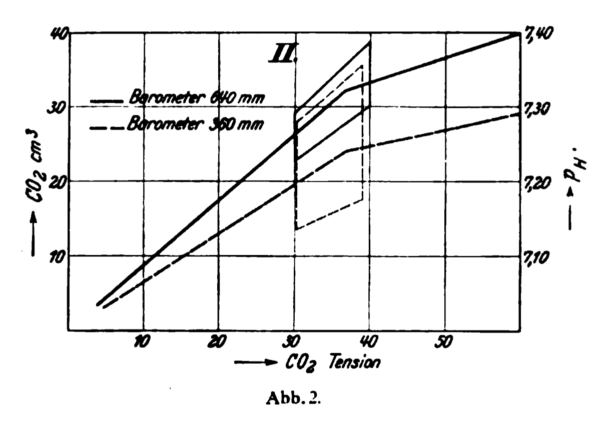


Abb. 2.

Aus der Tabelle ersieht man, daß bei den experimentell erzielten Luftverdünnungen die Wirkungen, welche bei der geringen natürlichen Verdünnung der Luft nur in geringem Maße zu beobachten waren, hier in gesteigertem Grade vorzufinden waren. Der p_H-Wert des Blutes zeigt eine ausgesprochene Acidosis, und damit vereint sinkt auch das CO_2-Bindungsvermögen des Blutes, trotz der fast konstanten Tension des CO_2. Für meine Resultate sprechen ebenfalls die in dem Davoser Institut durch *Laubender* (3) durchgeführten Versuche, der die Veränderung des Stoffwechsels bei vermindertem Luftdruck untersuchte.

Nach seinen Ergebnissen steigt die CO_2-Produktion in der ersten Stunde der Luftverdünnung um 30 bis 40 Proz. trotz unveränderten Sauerstoffverbrauchs. Er fand den Gesamtstickstoff in jedem Falle um 14 bis 59 Proz. im Urin erhöht. Interessanterweise steigt der Ammoniakkoeffizient trotz der erhöhten Stickstoffabgabe nur am zweiten Tage an.

Alle diese Erscheinungen kann man mit der entstandenen Acidosis zu erklären. Als Resultat der verminderten oxydativen Energie der Zellen entwickelt sich ein erhöhter Zerfall der Eiweißkörper, welcher als Folgen einerseits die Erzeugung von abnormen Säuren, andererseits eine verminderte Produktion an CO_2 nach sich ziehen wird. Um die entstandenen Säuren zu neutralisieren, mobilisiert der Organismus teilweise Ammoniak, teilweise aber Alkalimetallionen. Aus den Beobachtungen von *Salkowski* wissen wir, daß der Organismus, um die Acidität zu kompensieren, bei den Carnivoren hauptsächlich Ammoniak, bei den Herbivoren eher Alkalimetalle (Na, K) gebraucht. Die Säuren binden nun auf eine solche Weise die zur Bindung der Kohlensäure gebrauchten Komponenten, sie spülen die CO_2 quasi aus dem Blute heraus. Damit kann man die Überproduktion an Kohlensäure und die Verminderung des Kohlensäurebindungsvermögens erklären. Die Vermehrung des Stickstoffs ist eine Folge des gesteigerten Zerfalls der Eiweißstoffe. Dagegen könnte man die Tatsache, daß der Ammoniakkoeffizient sich erst später erhöht, nach meiner Auffassung damit erklären, daß Herbivoren (*Laubender* arbeitete auch mit diesen) in erster Reihe Alkalimetalle zur Kompensierung gebrauchen, und erst wenn sie diese Reserve aufgebraucht haben, beginnen sie die Ammoniakkompensation.

Wir hielten es für interessant zu sehen, ob die Kompensation der abnormen Säurebildung bei Fleischfressern nicht vollkommener wäre, da diese Tiere ihren großen Ammoniakvorrat dazu aufbrauchen können. Ich dehnte nun meine Versuche auf Katzen aus, bei denen ich in der obigen Weise die gleichen Werte bestimmte.

Als Vorbemerkung sei hinzugefügt, daß Katzen die Luftverdünnung viel schlechter ertragen als Kaninchen. Oberhalb einer gewissen Höhe, ungefähr 2000 m, bekommen diese Tiere Krämpfe, welche sich wiederholen und unter denen sie dann zugrunde gehen. Eben dasselbe konnte ich auch bei meinen Versuchen konstatieren, denn bei einer Verminderung des Druckes um 150 bis 200 mm wurden die Tiere nach 5 bis 10 Minuten ohne eine ausgesprochene Dyspnoe unruhig, und nach einigen weiteren Minuten, wenn wir den Druck nicht erhöhten, von starken tonischen Krämpfen befallen. Bei einem Falle ging das Tier nach 14 Anfällen ein, trotzdem keine Spuren von Erstickung zu konstatieren waren.

Die beobachteten Veränderungen seitens des Blutes waren gegen unsere Erwartung. Wir dachten nämlich an eine vollkommenere Kompensation, an eine viel ausgeprägtere als bei den Kaninchen. Die Resultate sind die hier beigefügten:

Normal				Artifizielle Luftverdünnung					Bemerkungen
Nr.	p_H	CO_2-Tens.	CO_2-Bindung	Nr.	p_H	CO_2-Tens.	CO_2-Bindung	Luftverdünnung	
1	7,67	37,5	40,0	1	7,14	37,4	22,0	150	Ruhig
2	7,60	38,2	44,0	2	7,35	38,0	32,2	170	Krämpfe
3	7,50	37,7	40,6	3	7,27	37,3	30,3	150	Ruhig
4	7,58	37,5	42,8	4	7,31	37,7	27,7	200	Unruhig
5	7,62	37,8	45,0	5	7,20	37,5	33,0	170	"
Mittel	7,59	37,7	42,4	Mittel	7,25	37,5	29,0	168	

Wie wir sehen, sind die Verschiebungen bei den Katzen trotz unsen Erwartung viel größer als bei den untersuchten Herbivoren. Wir schließe zur Erklärung dieser eigentümlichen Erscheinung darauf, daß diese Tie zur Kompensierung der Acidosis in erster Reihe ihr Ammoniak verbrauche und danach ihre Alkalimetallreserve nicht mobilisieren können bzw., d sie nur eine sehr kleine Ionenreserve besitzen, müssen sie, um die Kompe sation aufrecht zu erhalten, ihre Zellen angreifen und Alkaliionen fr

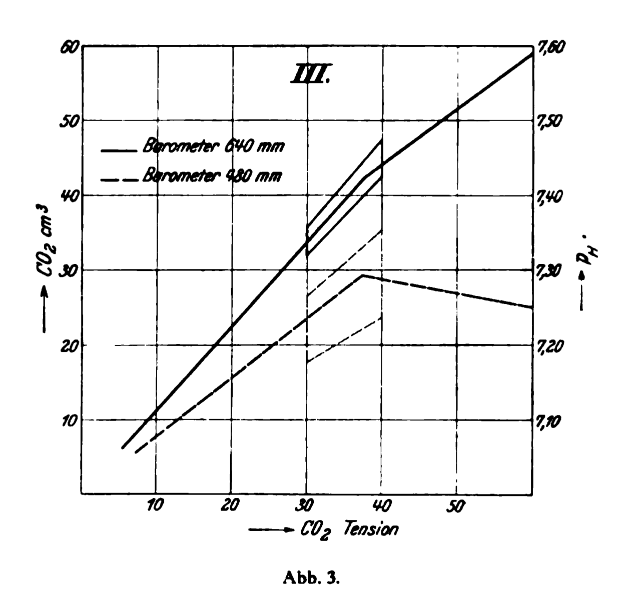


Abb. 3.

machen. Daß diese Auffassung die richtige ist, darauf deuten jene Krämpfe, welche nach dem Auftreten der Acidosis bei diesen Tieren sich einstellen. Es scheint, daß die Produktion von Ammoniak nicht parallel mit dem Verlauf der Acidosis ist. Diese meine Beobachtungen, daß die Katzen viel weniger Resistenz gegen eine Acidosis besitzen, bestärken die vor Jahren gemachten ähnlichen Beobachtungen von *Szili* (4), wonach gegen eine intravenöse Säurezufuhr die Carnivoren viel weniger resistent waren als die Herbivoren.

Der Grund jener Erscheinungen ist bisher noch nicht aufgeklärt, und es sind im Davoser Forschungsinstitut diesbezügliche Arbeiten im Gange. Durch meine Arbeiten ist bewiesen, daß sowohl bei den herbivoren Tieren wie bei den carnivoren Katzen durch die Verminderung der O_2-Tension eine primäre Acidosis entsteht.

Zusammenfassung.

1. Sowohl die natürlichen wie die artifiziellen Luftverdünnungen führen infolge Mangel an O_2 zur Acidosis der Organe.

2. Die Größe dieser Acidosis ist mit der Verschiebung der p_H des [Bl]utes und mit der Verminderung des CO_2-Bindungsvermögens zu [me]ssen.

3. Die carnivoren Katzen kompensieren diese Acidosis schwerer [al]s die herbivoren Kaninchen.

Literatur.

1) *Duzár-Fritz,* Klin. Wochenschr. 7, 51. — 2) *Holló-Weiss,* diese [Zeit]schr. **144**, Heft 1. — 3) *Laubender,* ebendaselbst **162**, 316. — 4) *Szili,* [Or]v. Ärzt. Arch. 1907.

Über die Wirkung der verschieden konzentrierten Kationenlösungen auf die osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen

Von

Alexander Simon.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Pázmány-Péter-Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 29. Januar 1926.)

Die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen desselben Kations auf die osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen fand bei den Forschern bisher nur wenig Beachtung. Es ist schon lange bekannt, daß $CaCl_2$ in niedriger Konzentration resistenzerhöhend wirkt und in höherer die Resistenz herabsetzt, auch kennen wir die Veränderungen, die das Blutkörperchen durch verschieden konzentrierte Sublimatlösungen erleidet [*Bechhold* (1)]. Weiter ist von As (2) und Pb (3) bewiesen, daß sie, in minimalen Mengen der Blutkörperchenemulsion zugefügt, diese gegen Hämolyse schützen. Endlich fand *Watermann* (4), daß Cd und Cu in gewissen Mengen die Ätherhämolyse verhindern. Er glaubt, daß diese Erscheinung auch bei der Hypotoniehämolyse gültig sei, scheint aber in dieser Hinsicht keine ausführlichen Versuche vorgenommen zu haben.

Als es mir voriges Jahr zu beweisen gelungen war, daß das Wismut in der Form „Bismoluol“ (Dikaliumwismuttartrat) in sehr großer Verdünnung (1 : 2500 bis 1 : 20000) resistenzerhöhend wirkt, in kleineren Verdünnungen die Resistenz herabsetzt und sogar Hämolyse hervorruft (5), ebenso wie dies bei $CaCl_2$ der Fall ist, faßte ich den Entschluß, eine bisher fehlende systematische Untersuchung der Wirkung der verschieden konzentrierten Kationenlösungen vorzunehmen, in der Hoffnung, einer Gesetzmäßigkeit zu begegnen.

Die Methode, welcher wir uns in diesen Versuchen bedienten, war kurz die folgende.

Um der Anionenwirkung vorzubeugen, gebrauchten wir zu den Versuchen immer nur Chloride. Das Salz wurde in physiologischer NaCl-

Lösung gelöst, die verschiedenen Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt. Gleich große Reagenzröhrchen wurden mit 2 ccm der Lösung beschickt, dann wurde zu einem jeden 0,35 ccm defibriniertes Menschenblut gegeben und ein paarmal gelinde geschüttelt. Ein Röhrchen diente zur Kontrolle; dieses wurde nur mit 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung und 0,35 ccm Blut versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit, welche bei den Alkali- und Erdalkalisalzen gewöhnlich eine halbe Stunde, bei den Schwermetallsalzen meistens nur 12 Stunden betrug, wurden die Röhrchen stark abzentrifugiert und die oben stehende Lösung möglichst ganz abpipettiert. Die Prüfung der Resistenz der so behandelten Blutkörperchen geschah folgendermaßen: Aus jedem Reagenzröhrchen wurde je ein Bluttropfen mit Hilfe einer Mikropipette in je vier kleine, gleich große Reagenzröhrchen gesetzt (bei den sehr hypertonischen Lösungen geht dies zuweilen schwer, aber doch genügend genau), worin sich 1 ccm hypotonischer NaCl-Lösung befand. Das erste enthielt 1 ccm 0,50proz., das zweite 1 ccm 0,45proz., das dritte 1 ccm 0,40proz. und das letzte 1 ccm 0,35proz. NaCl-Lösung. Es wurde kurz geschüttelt. Nach ungefähr 15 Minuten wurde abzentrifugiert und der so hervorgerufene Grad der Hämolyse kolorimetrisch in Prozenten bestimmt. Die Bestimmung geschah nach *Arrhenius* und *Madsen*. Drei Blutstropfen aus dem Kontrollröhrchen wurden in 3 ccm destillierten Wassers gelöst und so eine 100proz. Hämolyse hervorgerufen. Aus dieser Lösung wurden dann durch Verdünnung auf je 1 ccm, Lösungen in gleich großen Reagenzröhrchen hergestellt, in welchen so 80-, 70-, 50-, 40-, 30-, 20- und 10proz. Hämolyse entstand. Mit diesen Röhrchen wurden die hypotonische NaCl-Lösung enthaltenden Eprouvetten verglichen und so der Grad der Hämolyse bestimmt. Unterschiede bis zu 5 Proz. konnte man sehr gut interpolierend schätzen.

Als prinzipiellen Fehler dieser Methode könnte man uns vielleicht vorwerfen, daß, da wir die Salze in physiologischer NaCl-Lösung gelöst haben, es sich hier in der Tat immer um die Wirkung zweier Kationen handelt. Wir mußten dies aber tun, denn wir gebrauchten zuweilen sehr geringe Konzentrationen der betreffenden Salze, so daß mit Lösungen dieser Salze allein überhaupt nicht gearbeitet werden könnte; zweitens ist die physiologische NaCl-Lösung noch immer jene, die die kleinste Veränderung in den Blutkörperchen verursacht. [*Hamburger* (6) empfiehlt statt NaCl-Lösung isotonische Na_2SO_4-Lösung, da diese aber mit den Erdalkalisalzen eine Fällung gibt, war sie für unsere Zwecke unbrauchbar.] Rohrzucker und andere Nichtleiter, woran man noch denken könnte, sind mehr schädlich für die Blutkörperchen [*Höber*, *Memmesheimer* (7)] als NaCl, was auch wir bestätigen können.

Eine antagonistische Wirkung zwischen Na˙ und K˙, dann zwische
Na˙ und Ca˙˙, war bei diesen Versuchen nicht auffallend.

Wir untersuchten zunächst die *Wirkung der Alkali- und Erdalkal
chloride.* Es wurde mit LiCl, KCl, NaCl, $(NH_4)Cl$ und mit CaCl
$MgCl_2$ gearbeitet. Als Ergebnis dieser Versuche konnten wir fes
stellen, daß die genannten Salze, mit Ausnahme von $(NH_4)Cl$, ebens
auf die roten Blutkörperchen wirken, wie wir dies damals von Wismu
erfuhren (5). Nämlich: sie rufen in gewissen Konzentrationen Hämolys
hervor, dann zeigt sich bei stufenweise geminderter Konzentratio
keine Hämolyse, sondern Resistenzerniedrigung, welche plötzlich i
eine Resistenzerhöhung übergeht, und am Ende, bei ganz gering
Konzentration, üben die genannten Salze keine Wirkung auf di
Resistenz aus.

Wie erwähnt, konnten wir die genannten Veränderungen mi
$(NH_4)Cl$ nicht hervorrufen; hier zeigte sich nur Hämolyse und Resistenz
erniedrigung. Da aber dieses Salz, wie vielfach angenommen, leicht i
das Innere der Blutkörperchen eindringt, wie die anderen es nich
tun können, ist diese Abweichung nicht überraschend, sondern ehe
erwartet.

Zur näheren Illustrierung unserer Ergebnisse sollen aus den vielen
Versuchen die folgenden Tabellen dienen.

Tabelle I.

LiCl.

Inkubationszeit: ½ Stunde. Es zeigt sich Hämolyse in den 3, 1,5, 0,75 mol.
Lösungen enthaltenden Röhrchen. Die Resistenz dieser Röhrchen bezieht
sich auf die übriggebliebenen Blutkörperchen.

Na Cl Proz.	Kontrolle	3 mol.	1,5. mol.	0,75. mol.	1/3. mol.	1/6. mol.	1/12. mol.	1/24. mol.	1/48. mol.
0,50	0	100	100	30	0	0	0	0	0
0,45	10	100	100	30	0	5	10	10	10
0,40	100	100	100	30	30	70	80	80	85
0,35	100	100	100	75	100	100	100	100	100

Tabelle II.

KCl.

Inkubationszeit: ½ Stunde. Es zeigt sich Hämolyse in den 3, 1,5, 0,75 mol.
Lösungen enthaltenden Röhrchen. Die Resistenz dieser Röhrchen bezieht
sich auf die übriggebliebenen Blutkörperchen.

Na Cl Proz.	Kontrolle	3 mol.	1,5. mol.	0,75. mol.	1/3. mol.	1/6. mol.	1/12. mol.	1/24. mol.	1/48. mol.
0,50	0	100	100	40	20	9	0	0	0
0,45	20	100	100	50	25	10	Spuren	10	20
0,40	85	100	100	80	50	30	70	75	85
0,35	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle III. NaCl.

Inkubationszeit: ½ Stunde. Es zeigt sich Hämolyse in den 3, 1,5, 0,75 mol. Lösungen enthaltenden Röhrchen. Die Resistenz dieser Röhrchen bezieht sich auf die übriggebliebenen Blutkörperchen.

NaCl Proz.	Kontrolle	3 mol.	1,5 mol.	0,75 mol.	1/3 mol.	1/6 mol.	1/12 mol.	1/24 mol.	1/48 mol.
0,50	0	100	100	80	25	0	0	0	0
0,45	20	100	100	80	35	5	ny	15	25
0,40	85	100	100	85	40	50	30	85	85
0,35	100	100	100	100	35	100	100	100	100

Tabelle IV. $(NH_4)Cl$.

Inkubationszeit: ½ Stunde. Hämolyse 0.

NaCl Proz.	Kontrolle	1/3 mol.	1/6 mol.	1/12 mol.	1/24 mol.	1/48 mol.	1/96 mol.	1/192 mol.
0,50	0	100	100	80	30	Spuren	0	0
0,45	5	100	100	100	70	10	5	5
0,40	85	100	100	100	85	85	85	80
0,35	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle V. $CaCl_2 + 6\,H_2O$.

Inkubationszeit: ½ Stunde. Um mit den bei den vorherigen Salzen gebrauchten Konzentrationen annäherungsweise isotonische Lösungen zu haben, gebrauchten wir 2,25 mol., 1,12 mol. usw. $CaCl_2 + 6\,H_2O$-Konzentrationen. Es zeigt sich Hämolyse in den 2,25, 1,125, 0,56 mol. Lösungen enthaltenden Röhrchen. Die Resistenz dieser Röhrchen bezieht sich auf die übriggebliebenen Blutkörperchen.

NaCl Proz.	Kontrolle	2,25 mol.	1,12 mol.	0,56 mol.	1/4 mol.	1/8 mol.	1/16 mol.	1/32 mol.	1/64 mol.
0,50	0	100	100	70	15	10	0	0	0
0,45	Spuren	100	100	80	30	10	0	0	0
0,40	25	100	100	85	30	15	10	15	30
0,35	100	100	100	85	50	70	70	95	95

Tabelle VI. $MgCl_2 + 6\,H_2O$.

Inkubationszeit: ½ Stunde. Ebenso wie früher: 2,25, 1,17 mol. usw. Lösungen. Es zeigt sich Hämolyse in den 2,25, 1,12, 0,56 mol. Lösungen enthaltenden Röhrchen. Die Resistenz dieser Röhrchen bezieht sich auf die übriggebliebenen Blutkörperchen.

NaCl Proz.	Kontrolle	2,25 mol.	1,12 mol.	0,56 mol.	1/4 mol.	1/8 mol.	1/16 mol.	1/32 mol.	1/64 mol.
0,50	0	100	100	50	5	0	0	0	0
0,45	5	100	100	50	5	0	0	5	5
0,40	80	100	100	60	10	30	35	80	80
0,35	100	100	100	30	30	80	85	35	100

Wenn wir die Wirkung von $(NH_4)Cl$ vernachlässigen, ergibt sich au den Tabellen und unseren anderen Versuchen, daß die resistenzsteigernd Wirkung der Salze ungefähr bei $^1/_{48}$ bis $^1/_2$ mol. beginnt und in verschiedene Konzentrationsbreite andauert, weiter daß, wenn die Konzentration noc weiter gesteigert wird, wir bei manchen Salzen Resistenzerhöhung und -er niedrigung zugleich bekommen, was zweifelsohne auf der verschiedene „Sensibilität" der einzelnen Erythrocyten beruht. Endlich bei noc größeren Konzentrationen gelangen wir zur allgemeinen Resistenz erniedrigung allein oder mit Hämolyse kombiniert, welch letztere imme mehr zunimmt.

Unser zweites Augenmerk richtete sich darauf, ob sich in der Wirkungs stärke der einzelnen Kationen eine Regelmäßigkeit kundgibt; näher be stimmt, ob es bei dieser Wirkung der Kationen, ebenso wie bei der Hypo toniehämolyse und für die Anionen auch bei der Hypertoniehämolyse schon bewiesen ist (8) (9), daß die *Hofmeister*sche Reihe gültig ist.

Für diesen Zweck geben wir die nachstehende Zusammenstellung au unseren Versuchen, welche jene Konzentrationen angibt, wo die Resistenz erniedrigung der verschiedenen Menschenblutproben in 0,50proz. NaCl Lösung aufhört.

Tabelle VII.

LiCl mol.	KCl mol.	NaCl mol.	$MgCl_2$ mol.	$CaCl_2$ mol.
$^1/_3$	$^1/_6$	$^1/_6$	$^1/_8$	$^1/_{32}$
$^1/_3$	$^1/_6$	$^1/_6$	$^1/_8$	$^1/_{32}$
$^1/_3$	$^1/_6$	$^1/_6$	$^1/_8$	$^1/_8$
$^1/_6$	$^1/_6$	$^1/_6$	$^1/_8$	$^1/_{32}$
	$^1/_3$	$^1/_6$		
	$^1/_{12}$	$^1/_6$		

Nach der Tabelle VII hört die Resistenzerniedrigung in den größten Konzentrationen bei LiCl auf. Bei KCl, NaCl und $MgCl_2$ sind diese Konzentrationen kleiner, aber untereinander ungefähr gleich, und noch geringere Konzentrationen fanden wir im Falle der Ca-Wirkung.

Die gleiche Reihenfolge beobachteten wir auch für die Resistenzsteigerung. Es zeigt sich also eine Resistenzerhöhung in den kleinsten Konzentrationen erst bei $CaCl_2$, in den größten bei LiCl. Bei KCl, NaCl und $MgCl_2$ beginnt diese Wirkung zwischen diesen zwei Extremen.

Über den Einfluß der Kationen bei der Fällung hydrophiler Kolloide sagt *Höber* in seinem bekannten Werke (10) folgendes: „Die einzelnen Kationen unterschieden sich in ihrer Fällungskraft nicht sehr erheblich voneinander (*Hofmeister*, *Pauli*). Nach meinen Untersuchungen werden Hühnereiweiß, Serumalbumin und Lecithin durch Chloride etwa in der Reihenfolge Li, Cs, Na, Rb, K beeinflußt. Die Erdalkalikationen wirken im allgemeinen stärker als die Alkalikationen; nur Mg kommt ungefähr den Alkalien an Wirkung gleich."

Diese Beobachtungen berücksichtigend, glauben wir feststellen zu können, daß unsere Ergebnisse betreffend die Wirkung der genannten Salze auf die Blutkörperchenresistenz im großen und ganzen mit den *Höber*schen Versuchen gut im Einklang stehen.

Die letzte Reihe unserer Untersuchungen bildete die Erforschung der Wirkung einzelner Schwermetallsalze. Wie am Anfang der Arbeit erwähnt, ist von As und Pb die resistenzsteigernde Wirkung bewiesen worden, auch

bekannt, daß $CuCl_2$ und $CdCl_2$ die Blutkörperchen in den Konzen-
nen $^1/_{500}$ bis $^1/_{10000}$ gegen Ätherhämolyse schützen. Endlich bildete
Ausgangspunkt der ganzen Untersuchung die von mir festgestellte
von der Konzentration abhängende interessante Wirkung des
nts (5).

In diesen Versuchen untersuchten wir zunächst das von Cu und Cd fest-
llte erwähnte Ergebnis. Wie aus der Tabelle VIII zu ersehen ist,
t $CuCl_2$ und $CdCl_2$ in gewissen sehr kleinen Konzentrationen die
rperchen auch gegen die Hypotoniehämolyse. In größeren Mengen
n sie ebenso wie Wismut und die Alkali- und Erdalkalikationen
nzerniedrigend, zuletzt fällen sie die Blutkörperchen als eine ge-
e deformierte Masse ab.

Tabelle VIII.

$CdCl_2 + 2 H_2O$.

bationszeit: 13 Stunden. In den $^1/_{300}$- bis $^1/_{200}$ mol. Lösungen enthaltenden Röhrchen gedunsene, deformierte Masse.

NaCl Proz.	Kontrolle	$^1/_{300}$- mol.	$^1/_{600}$- mol.	$^1/_{1200}$- mol.	$^1/_{2400}$- mol.	$^1/_{4800}$- mol.	$^1/_{9600}$- mol.	$^1/_{18200}$- mol.
0,50	0	Ge-	Ge-	40	15	0	0	0
0,45	25	dun-	dun-	40	40	10	20	20
0,40	85	sene	sene	85	85	50	85	85
0,35	100	Masse	Masse	85	35	85	95	100

Die resistenzsteigernde Wirkung des $CuCl_2$ sieht man sehr schön
s der

Tabelle IX.

$CuCl_2 + 2 H_2O$.

Inkubationszeit: 12 Stunden.

NaCl Proz.	Kontrolle	$^1/_{300}$ mol.	$^1/_{600}$ mol.	$^1/_{1200}$ mol.	$^1/_{2400}$ mol.	$^1/_{4800}$ mol.
0,50	0	0	0	0	0	0
0,45	25	25	10	10	25	25
0,40	85	80	60	85	85	85
0,35	100	85	80	90	100	100

Endlich haben wir mit $FeCl_3 + 6 H_2O$ Versuche angestellt und, wie
ichtlich, auch hier das früher Mitgeteilte gefunden.

Tabelle X.

$FeCl_3 + 6 H_2O$.

Inkubationszeit: 13 Stunden.

NaCl Proz.	Kontrolle	$^1/_{192}$ mol.	$^1/_{384}$ mol.	$^1/_{768}$ mol.	$^1/_{1536}$ mol.	$^1/_{3072}$ mol.
0,50	0	40	30	20	10	15
0,45	25	50	50	50	10	30
0,40	85	90	100	100	30	100
0,35	100	90	100	100	35	100

Interessant sind die kleinen Konzentrationen, in welchen sich i
Gegensatz zu den Alkali- und Erdalkalisalzen die Resistenzsteigerung zeig
Zusammenfassend können wir sagen, daß diese Wirkung bei den erwähnte
Schwermetallsalzen in $^1/_{600}$ bis $^1/_{10000}$ mol. Konzentration zu finden ist.

In den letztgenannten Versuchen gebrauchten wir meistens eine 1
bis 14stündige Inkubationszeit. Der Grund hierfür war, daß, da eine R
sistenzerhöhung durch $FeCl_3$, $CuCl_2$, $CdCl_2$ in einer halben und in ein
Stunde nicht in jedem Falle zum Vorschein kam, wir annahmen, daß d
einstündige Inkubationszeit zu kurz sei. Dies war aber nicht der Fal
denn auch bei 14stündiger Inkubation fanden wir nicht immer Resistenz
steigerung. Die Ursache dieser Erscheinung können wir nicht sicher a
geben; es kann aber möglich sein, daß, da die Resistenzsteigerung durc
die Schwermetallsalze vielmals nur in einer kleinen Konzentrationsbrei
zum Vorschein kam und da zwischen jenen Konzentrationen, dere
Wirkung wir untersuchten, ziemlich große Intervalle waren, die resistenz
steigernde Wirkung in dieses nicht versuchte, überspringende Konzen
trationsgebiet fiel.

Die resistenzsteigernde Wirkung der Schwermetallsalze ist also trot
der minimalen Konzentrationen auch nach 12 bis 14 Stunden kräftig
Wir veranstalteten Versuche, zu prüfen, wie es mit den Alkali- und Erd
alkalisalzen nach so langer Inkubationszeit steht.

Tabelle XI.

KCl.

Inkubationszeit: 12 Stunden.

NaCl Proz.	Kontrolle	$^1/_3$ mol.	$^1/_6$ mol.	$^1/_{12}$ mol.	$^1/_{24}$ mol.	$^1/_{48}$ mol.
0,50	0	20	15	Spuren	0	0
0,45	25	45	45	35	20	30
0,40	100	90	100	35	35	35
0,35	100	100	100	100	100	100

Tabelle XII.

$CaCl_2 + 6 H_2O$.

Inkubationszeit: 12 Stunden.

NaCl Proz.	Kontrolle	$^1/_4$ mol.	$^1/_8$ mol.	$^1/_{16}$ mol.	$^1/_{32}$ mol.
0,50	Spuren	60	50	20	20
0,45	20	70	55	30	20
0,40	80	80	80	70	70
0,35	100	80	85	85	95

Bei den Alkalikationen fanden wir, daß die Resistenzsteigerung nach
12 Stunden aufhört und in eine mit der Konzentration abnehmende Resistenzerniedrigung umschlägt; die resistenzsteigernde Wirkung des $CaCl_2$
ist noch in der zwölften Stunde vorhanden, aber nicht so stark wie nach
einer halben Stunde, und bei vielen Blutkörperchen zeigt sich schon Resistenzerniedrigung.

Unsere ganze Arbeit zusammenfassend, glauben wir annehmen zu können, daß wir bei der Wirkung der verschieden konzentrierten Kationenlösungen auf die Resistenz der roten Blutkörperchen einer allgemeinen Regelmäßigkeit gegenüber stehen. Es gibt ja Ausnahmen von dieser Regel, wie dies bei $(NH_4)Cl$ und vielleicht bei $HgCl_2$ (nach *Bechhold*) der Fall ist, aber *im großen und ganzen üben die anorganischen Kationen eine resistenzsteigernde bzw. eine resistenzerniedrigende Wirkung aus, und zwar nur von der Konzentration abhängend.* Schwermetallsalze erhöhen die Resistenz in $^1/_{600}$- bis $^1/_{10000}$ mol. Konzentration, Alkali- und Erdalkalisalze in $^1/_6$- bis $^1/_{48}$ mol. Konzentration.

Die Gültigkeit einer Reihe, die von der *Hofmeister*schen nicht sehr abweicht, ferner die Wirksamkeit der sehr geringen Schwermetallsalzkonzentrationen gegenüber der viel größeren der Alkali- und Erdalkalisalze beweisen, daß unsere Ergebnisse die Folgen der Änderungen der Blutkörperchenkolloide sind.

Wollen wir aber näher diese Änderungen erkennen, so müssen wir zuerst Näheres von unserer Auffassung über die Blutkörperchen berichten.

Auch nach unserer Meinung haben die Blutkörperchen eine Membran. Den exakten Beweis dafür lieferte *Ege* (11) [s. auch *R. Mond* (15)], dem in sehr schönen Untersuchungen unter anderem die Bestätigung des *van t' Hoff-Boyle-Mariotte*schen Gesetzes für die Volumenänderungen der Blutkörperchen infolge des osmotischen Druckes gelungen ist. Auch in morphologischer Hinsicht spricht die Arbeit *Lepeschinskajas* (12) dafür, daß die Annahme eines Blutkörperchenhäutchens doch nicht eine den Tatsachen widersprechende war. Sie konnte zeigen, daß die Membran sich anders färbt als das Plasma des Blutkörperchens. Und da sie, mit verschiedenen Fixatoren arbeitend, immer eindeutige Ergebnisse erreichte, glauben wir, daß ihre Membran kein Artefaktum ist.

Den Verteidigern der reinen Adsorptionstheorie bleibt noch die Tatsache der reversiblen Hämolyse (13) als große Stütze übrig. Nach unserer Meinung aber kann auch diese Erscheinung mit der Annahme einer Membran erklärt werden.

Der Einfachheit halber beschäftigen wir uns hier mit der reversiblen Hämolyse, verursacht durch Hypotonie. (Für die anderen Fälle der reversiblen Hämolyse ist die Erklärung auch nicht schwer.) Unsere Erklärung beruht auf der Annahme, daß 1. im Innern des Blutkörperchens das Hämoglobin nicht gelöst, sondern in adsorbiertem Zustande sich befindet, welche Auffassung unter anderem von *Liebermann* (14) und in der neuesten Zeit von *R. Mond* (15) behauptet worden ist, 2. die Blutkörperchenmembran für *gelöstes Hämoglobin* in gewissen Zuständen durchgängig ist.

Ruft man nun langsam Hypotonie hervor, dann wäscht das das Innere des Blutkörperchens hineingedrungene H_2O das Häm globin aus seiner Adsorption, und da die Membran infolge der Hypoton Veränderungen erleidet, wozu unter anderen die Untersuchungen v *Kenzo Hattori* (16) und *Neuschloss* (17) sprechen, kann das gelös Hämoglobin die Membran passieren und so die geringe osmotisch Kraft der äußeren Flüssigkeit vermehren. Nach dieser Auffassu sprengt es also die Membran bei langsamer Hypotoniehämolyse nich sondern er erfolgt eine Diffusion des Hämoglobins.

Gibt man nun NaCl zu der äußeren Flüssigkeit, dann diffundier da NaCl nicht in das Innere dringen kann und so osmotisches Übe gewicht in der äußeren Flüssigkeit herrscht, um das Gleichgewich herzustellen, H_2O aus dem Blutkörperchen heraus, das Hämoglobi diffundiert hinein, und es wird wieder adsorbiert, und letztens wird auc der normale Zustand der Membran so weit wie möglich hergestell

Die einzige Achillesferse dieses Erklärungsversuchs ist die Be rechtigung der Vorstellung, daß das Blutkörperchenhäutchen durch lässig ist, wenn auch nicht immer für das große Hämoglobinmolekül da selbst Kristalloide nicht in das Blutkörperchen dringen können Aber die Membran verhält sich auch gegen Kristalloide nicht in einfach erklärlicher Weise. Nach *R. Ege* (16) ist die Diffusionsgeschwindigkeit der permeierenden Anionen nicht immer proportional mit der Ionenzahl der betreffenden Anionen, hat Br (80. Ionenzahl) eine größere Permeabilitätsgeschwindigkeit als NO_3 (62. Ionenzahl), und Li (4. Ionenzahl) vermag überhaupt nicht das Blutkörperchenhäutchen zu durchdringen, während Anionen, wie $Cl^{\cdot}$, $SO_4^{\cdot\cdot}$, $HPO_4^{\cdot\cdot}$, die eine viel größere Ionenzahl besitzen, dazu imstande sind.

Angenommen, die Existenz einer Membran übe ihre Wirkung der verschieden konzentrierten Kationlösungen aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Membrankolloide aus. *Die Resistenzsteigerung und Erniedrigung sind daher Folgen der Änderungen der Membransubstanzen.* Die Resistenzsteigerung durch Salzlösungen wäre also so zu deuten, daß infolge der Änderung der Membrankolloide das gelöste Hämoglobin schwerer die Membran durchdringen kann; bei der Resistenzerniedrigung würden natürlich die entgegengesetzten Verhältnisse ihre Geltung haben.

Da nach *Neuschloss* (17) KCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ bei steigender Konzentration bis zu $^1/_{16}$ bis $^1/_8$ mol. — wo es seine Maximalwirkung erreicht — die Oberflächenspannung des Lecithinsols erhöhen, entspricht wahrscheinlich die Resistenzsteigerung der Blutkörperchen dieser maximalen Oberflächenspannungserhöhung. In größeren Konzentrationen vermindert sich nach *Neuschloss* die erreichte Oberflächenspannung, ohne zur normalen wieder zurückzukehren, so daß die Resistenzerniedrigung nicht einfach mit der einfachen Rückkehr dieser

Erscheinung erklärt werden kann; es müssen auch weitgehendere Änderungen der Membransubstanzen entstehen als eine Vermehrung des Dispersitätsgrades des Membranlecithins, wie *Neuschloss* behauptet.

Zusammenfassung.

1. Da nach meinen Ergebnissen KCl, NaCl, LiCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$ und Bismoluol (Dikaliumwismuttartrat) von der Konzentration abhängend auf die osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen in vitro erhöhend bzw. vermindernd wirken, glaube ich zu dieser Wirkung einer auf die Mehrheit der Alkali-, Erdalkali- und Schwermetallkationlösungen gültigen Gesetzmäßigkeit gegenüberzustehen.

2. Die Wirkung der Alkali- und Erdalkalikationen auf die Resistenz der roten Blutkörperchen entspricht der folgenden Reihe: $Li^{\cdot} < Na^{\cdot}$, $Li^{\cdot} < Mg^{\cdot\cdot} < Ca^{\cdot\cdot}$.

3. Auf Grund der Existenz einer Blutkörperchenmembran ist ein Erklärungsversuch der reversiblen Hämolyse und der experimentellen Ergebnisse der Abhandlung gegeben.

Literatur.

1) *Bechhold* und *Kraus*, diese Zeitschr. **109**. — 2) *Gunn*, British Med. Journ., Juli 1908. — 3) *Aub*, *Reznikoff*, *Smith*, Ref. Ber. über d. ges. Phys. **9**, 488. — 4) *Waterman*, diese Zeitschr. **116**. — 5. *A. Simon*, ebendaselbst **159**. — 6) *Hamburger*, ebendaselbst **129**. — 7) *Höber* und *Memmesheimer*, Pflügers Archiv 1918. — 8) *Höber*, diese Zeitschr. **14**. — 9) *Acél* und *Lorber*, ebendaselbst **147**, 557, 1924. — 10) *Höber*, Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe 1924, S. 269. — 11) *R. Ege*, diese Zeitschr. **130**. — 12. *Lepeschinskaja*, Folia Haemat., Januar 1925. — 13) *Bogendörfer* und *Halle*, diese Zeitschr. **160**, 199, 1925 (s. weitere Literatur dort). — 14) *Liebermann*, Arch. f. Hyg. **62**. — 15. *R. Mond*, Pflügers Arch. **208**. — 16) *Kenzo Hattori*, diese Zeitschr. **119**. — 17) *S. M. Neuschloss*, Pflügers Arch. 1920.

Über die enzymatische Abspaltung von Rohrzucker aus Salze[n] der Saccharose-phosphorsäure.

Von

Carl Neuberg und **Martin Behrens.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Zwischen der Konstruktion der *Saccharose-phosphorsäure* (I), dere[n] Synthese[1]) vor 16 Jahren beschrieben worden ist, und dem Bau de[r] *Raffinose* (II) sind gewisse Analogien vorhanden:

I. Fructose-Glucose-Galaktose.

II. Fructose-Glucose-Phosphorsäure.

Damit im Einklange steht, daß in bezug auf beide Verbindunge[n] bestimmte Ähnlichkeiten auch in der Angreifbarkeit durch hydro-lysierende Agenzien — von rein chemischer Wirkungsweise wie vo[n] biologischer Natur — zutage treten. Durch starke Mineralsäure[n] werden beide Substanzen in ihre drei Komponenten zerlegt. Schwache insbesondere organische Säuren ermöglichen eine partielle Hydrolyse bei der aus der Raffinose Fruchtzucker nebst Glucose-Galaktose, das ist Melibiose, hervorgehen[2]) und bei der aus den Saccharo-phosphate[n] Fructose sowie Glucose-phosphorsäure entstehen[3]).

Eigenartig gestaltet sich der Einfluß der Enzyme. Seit langem ist bekannt, daß ein wässeriger Auszug von obergärigen Hefen die Raffinose teilweise spaltet und zur Bildung von Fructose und Melibiose Anlaß gibt. Diese Reaktion ist schon von *C. Scheibler* und *H. Mittelmeier*[4]) auf das Invertin bezogen und in neuerer Zeit von *R. Willstätter* und

[1]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **28**, 515; **26**, 521, 1910.

[2]) *C. Scheibler* und *H. Mittelmeier*, Ber. **22**, 1678, 1889; *A. Bau*, Chem. Zeitung **26**, 69, 1902.

[3]) *J. Hatano*, diese Zeitschr. **159**, 175; *S. Sabetay* und *L. Rosenfeld*, ebendaselbst **162**, 469, 1925.

[4]) *C. Scheibler* und *H. Mittelmeier*, Ber. **22**, 3118, 1889; *D. Loiseau*, Chem. Centralbl. **1897**, II, 520; **1903**, II, 1243; *H. E. Armstrong* und *W. H. Glover*, ebendaselbst **1908**, II, 1254; *E. Bourquelot* und *M. Bridel*, ebendaselbst **1911**, I, 1816; *C. S. Hudson* und *T. S. Harding*, ebendaselbst **1916**, I, 605.

R. Kuhn[1]) sowie R. Kuhn[2]) in physikalisch-chemischer, namentlich kinetischer Hinsicht näher erforscht mit dem Resultat, daß die Raffinose durch das gleiche Invertin wie Rohrzucker angegriffen wird.

Während die Säure-hydrolyse keinen Anhaltspunkt dafür geführen konnte, wie die Fructose sich dem Melibioserest einfügt, ergab die rein chemisch bisher nicht erreichte, aber enzymatisch durchgeführte Spaltung der Raffinose in Rohrzucker und Galaktose die Grundlage für die Auffassung der Raffinose als Galaktose-äther der Saccharose. Diese von *C. Neuberg*[3]) aufgefundene fermentative Hydrolyse der Raffinose zu Rohrzucker und Galaktose wurde von *H. Pringsheim* und *G. Zemplén*[4]) bestätigt für die Auswirkung einiger Invertase nicht führender Schimmelpilze und außerdem von *R. Willstätter* und *W. Csány*[5]); sie haben die Beziehungen und Abweichungen zwischen Galakto-raffinase und den gewöhnlichen β-Glucosidasen des „Emulsins" kinetisch festgelegt und für weitgehend gereinigte Präparate die bereits von *Neuberg* (l. c.) beobachtete langsame Ablösung des Galaktoserestes dargetan.

Analog zur erwähnten invertatischen Spaltung der Raffinose läßt sich nun nach *C. Neuberg* und *S. Sabetay*[6]) die invertatische Hydrolyse der Rohrzucker-phosphorsäure mittels Hefen-invertase bewerkstelligen, die den beiden genannten Autoren Fructose und Glucose-phosphorsäure lieferte. Dieses Ergebnis haben jüngst *R. Kuhn* und *H. Münch*[7]) bestätigt, indem auch sie durch Fructo-saccharase der Hefe eine Abspaltung der Lävulose aus Saccharo-phosphat ohne Ablösung von Phosphorsäure erzielen konnten; denn wie bereits *Neuberg* und *Sabetay* (l. c.) nachgewiesen haben, schließt das nach *R. Willstätter* und *F. Racke*[8]) aus Hefe bereitete Invertin im Gegensatz zur saccharasehaltigen[9]) „Takadiastase" [10]) keine aktive Phosphatase ein.

Die Analogie in der Angreifbarkeit durch Enzyme offenbart sich, wie wir zeigen werden, nun noch schärfer durch den *fermentativen Abbau der Rohrzucker-phosphorsäure zu Saccharose und anorganischem*

---

[1]) *R. Willstätter* und *R. Kuhn*, H. **115**, 183, 1921.
[2]) *R. Kuhn*, H. **125**, 71, 1923.
[3]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **3**, 519, 1907.
[4]) *H. Pringsheim* und *G. Zemplén*, H. **62**, 374, 1909; vgl. *Ch. Lefebvre*, Chem. Centralbl. **1908**, I, 396; *E. Bourquelot* und *M. Bridel*, ebendaselbst **1909**, II, 1497; *H. J. Waterman*, ebendaselbst **1914**, I, 485.
[5]) *R. Willstätter* und *W. Csány*, H. **117**, 174 u. 196, 1921.
[6]) *C. Neuberg* und *S. Sabetay*, diese Zeitschr. **162**, 479, 1925.
[7]) *R. Kuhn* und *H. Münch*, H. **150**, 232, 1925.
[8]) *R. Willstätter* und *F. Racke*, Ann. **425**, 53, 1921.
[9]) *G. Bertrand* und *Rosenblatt*, C. r. **156**, 261, 1913.
[10]) *S. Akamatsu*, diese Zeitschr. **142**, 184 u. 187, 1923; *J. Noguchi*, ebendaselbst **143**, 190, 1923; **147**, 255, 1924.

Phosphat. Um diese bisher unbekannte Reaktion durchführen
können, bedurften wir eines Agens, das gewissermaßen dem „Emulsi
gleichen mußte. Wie dieses frei von Invertase ist, aber die in Äth
bindung festgehaltene dritte Komponente Galactose aus Raffin
abzulösen vermag, so mußte das anzuwendende Fermentmaterial kei
Invertase, sondern nur eine auf rohrzucker-phosphorsaure Salze ei
gestellte *Phosphatase* enthalten. Vor Jahren haben *K. Djenab* u
C. Neuberg gefunden, daß bei Einwirkung der rohen Hefenphosphata
die beträchtliche Abspaltung von Phosphorsäure aus Saccharo-phosph
zuwege bringt, der Übergriff auf die Rohrzuckerkomponente nic
zu vermeiden ist, indem Rohrzuckerspaltung zusammen mit der Est
hydrolyse vor sich geht[1]).

Das geeignete Fermentmaterial bezogen wir aus dem *Tierreich*
M. Tomita[3]) hat im hiesigen Institut gezeigt, daß die verschieden
animalischen Gewebe, vornehmlich Niere und Muskel, Sacchar
phosphate unter Absprengung von Phosphorsäure zerlegen. Da b
kanntlich normalerweise — außer im Darm[4]) — Invertin nicht i
Körper der höheren Tiere[5]) auftritt (*Claude Bernard*, *E. Fischer* un
W. Niebel, *H. v. Euler*, *O. Svanberg* und *K. Myrbäck*), so konnten w
mit Hilfe der Nieren-phosphatase die Lösung der gestellten Aufgal
erreichen. Wir verwendeten für die Versuche sowohl Brei als auc
Saft von Pferdenieren, in dem genügend Phosphatase gelöst ist. Be
längerer Digestion von rohrzucker-phosphorsaurem Natrium ode
rohrzucker-phosphorsaurem Calcium mit Nierenferment wird in erhel
lichem Ausmaße Phosphorsäure in Freiheit gesetzt, ohne daß der Zucke
anteil zerfällt[6]). Wohl macht sich ein minimales Reduktionsvermöge
geltend, jedoch ist dasselbe auf die Verzuckerung von Gewebsbestan
teilen (wie Glykogen) zurückzuführen. Die Dephosphorylierung vollziel

[1]) *K. Djenab* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 82, 393. 1917.

[2]) Man darf erwarten, daß Rohrzucker nicht angreifende invertas
freie Pilze und Hefen (Typ. S. apiculatus) sowie auch manche höhere
Vegetabilien sich analog verhalten werden, da die Phosphatasen weit ve
breitet sind. Auch andere Kohlehydrat-phosphorsäuren dürfte man i
entsprechender Weise zu den phosphorsäurefreien Zuckern abbauen könne

[3]) *M. Tomita*, diese Zeitschr. 131, 161, 1922.

[4]) Literatur s. bei *C. Oppenheimer*, Fermente, 5. Aufl., I, 568—570, 192

[5]) Über das andersartige Verhalten der Verdauungssäfte nieder
Tiere s. *H. Bierry*, diese Zeitschr. 44, 445, 1912.

[6]) Für diese phosphatatische Hydrolyse ist die schon von *J. Hatano* (l. c
angeschnittene Frage nach der vollen Einheitlichkeit der Saccharophosphat
ohne Bedeutung; es ist an sich belanglos, ob das Phosphorsäure-radika
allein am Glucoserest haftet, oder ob auch ein Fructoseanteil mon
phosphoryliert ist, sofern die Phosphatase beide Hexosephosphorsäure
komponenten anzugreifen vermag, oder, wie es zutrifft, die Trennun
frei gewordenen Rohrzuckers vom Saccharophosphat durchführbar ist

h bei der natürlichen Reaktion des Organmaterials. Um aber einer
spezifischen Säurespaltung von Rohrzucker durch die bei der Organ-
tolyse entstehenden Säuren vorzubeugen, haben wir in der Mehrzahl
r Fälle entweder bei einem p_H von 7,3 gearbeitet[1]) oder durch Hinzu-
fung von kohlensaurem Calcium als Bodenkörper dauernd neutrale
aktionen aufrecht erhalten. Durch Beigabe von reichlich Toluol
rde stets für Sterilität gesorgt. Als Substrat können sowohl das
trale Natriumsalz, $C_{12}H_{21}O_{10} . O . PO_3Na_2$, als das neutrale Calcium-
z $C_{12}H_{21}O_{10} . O . PO_3Ca$, dienen; beide sind in Wasser leicht löslich.

Zum Nachweise des Rohrzuckers, der bei der enzymatischen Hydro-
e entsteht, haben wir uns nicht auf indirekte Verfahren zur Prüfung
r Reaktionsflüssigkeit beschränkt, sondern mehrfach das Disaccharid
Substanz isoliert. Das gelingt auf folgende Weise. Durch Erwärmen
f dem siedenden Wasserbad bei neutraler Reaktion wurde zunächst
gulables Eiweiß entfernt. Die vom Gerinnsel sowie vom Toluol ab-
trierte Flüssigkeit wurde — unter Zusatz von etwas Bariumcarbonat —
Vakuum oder in der *Faust-Heim*schen Verdunstungsapparatur zu
kem Sirup eingeengt. Diesem konnte durch Extraktion mit sie-
dem Äthylalkohol oder auch mit einem größeren Quantum Weingeist
i Zimmertemperatur der Rohrzucker entzogen werden, während
standteile des Fermentmaterials sowie abgespaltenes anorganisches
osphat nebst unangegriffenem Ausgangsprodukt (Natrium- oder
lciumsalz) zurückblieben.

Kleinere Mengen von Verunreinigungen traten natürlich in den
kohol über, so daß die Abscheidung des Rohrzuckers eine weiter
triebene Reinigung erforderte. Zu diesem Zwecke wurde der erste
oholische Auszug wiederum im Vakuum verdampft und der Rück-
nd von neuem in heißem Äthylalkohol aufgenommen, der auf 100 ccm
oluten Alkohol 1 ccm Wasser enthielt. Diese Behandlung mit
ca 99proz. Alkohol wurde so lange fortgesetzt, als noch nennenswerte
ngen Disaccharid in Lösung gingen, was daran zu erkennen war,
ß eine Probe nach hydrolytischer Spaltung durch Salzsäure deutliches
duktionsvermögen aufwies. Die vereinigten alkoholischen Extrakte
rden darauf im Vakuum erneut zu Sirup konzentriert und
ser nunmehr mit heißem, absolutem Methylalkohol ausgezogen,
bei sich alles oder nahezu alles lösen muß. Die klare methyl-
koholische Flüssigkeit blieb über Nacht stehen; dann schieden sich
i Zimmertemperatur noch kleine Mengen flockiger Beimischungen
s. Die abermals filtrierte Flüssigkeit wurde darauf mit einer ge-
ttigten Lösung von festem Bariumhydroxyd in reinem Methyl-
kohol ausgefällt, solange noch ein Niederschlag entstand. Diese

[1]) Vgl. *F. Demuth*, diese Zeitschr. 159, 415, 1925.

Fällung des in wasserfreiem Holzgeist gelösten Rohrzuckers dur absolut methylalkoholisches Bariumhydroxyd ist unseres Wisse bisher nicht benutzt worden; beschrieben ist nur[1]) die Fällung v wässerigen Rohrzuckerlösungen durch wässerig-alkoholischen Bar (Weingeistgehalt der Mischung = 60 Proz.). Die beträchtliche Löslic keit des Bariumhydroxyds in wasserfreiem Methylalkohol im Vere mit dem Lösungsvermögen des Holzgeistes für Saccharose mach unser Vorgehen sehr bequem. Der Rohrzucker wird dabei vollständ als Barytverbindung und diese in gut filtrierbarer Form gefällt[2]). Na Auswaschen der Bariumverbindung mit Methylalkohol und ihr Übertragung in Wasser kann durch Einleiten von Kohlendioxyd anfangs in der Kälte, später in der Wärme (Wasserbad) — der Roh zucker leicht regeneriert werden.

In den nach diesem Verfahren durch methylalkoholischen Bary erzeugten Niederschlag geht der aus dem Saccharophosphat in Freihe gesetzte Rohrzucker ein; ein Teil noch anhaftender Verunreinigunge bleibt bei der Zerlegung mit Kohlensäure unlöslich zurück. Die vo Bariumcarbonat getrennte und mit etwas Knochenkohle geschüttelt sowie filtrierte Flüssigkeit ist schon eine recht reine Rohrzuckerlösung aber immerhin noch nicht rein genug, um direkt zu kristallisieren. Um die Saccharose in einwandfreien Kristallen zu erhalten, dampften wi die wässerige Lösung wiederum im Vakuum ein. In diesem Rückstand waren nach Zerstörung der organischen Substanz höchstens noch Spuren Phosphor nachzuweisen. Durch abermaliges Auskochen mi Holzgeist, der als Residuum im wesentlichen Bariumcarbonat hinterließ gewannen wir eine methylalkoholische Rohrzuckerlösung, die vorsichti mit absolutem Äther bis zum Auftreten einer Trübung versetzt und i einer verschlossenen Glasstöpselflasche aufbewahrt wurde[3]). Es schiede sich beim Stehen in großer Kälte zumeist direkt Kristalle ab, die dan nach mehrtägiger Aufbewahrung abgesaugt wurden und durch Um kristallisation aus heißem Wasser reinen Rohrzucker lieferten. I anderen Fällen versagte das Verfahren der Anwendung einer Rohr zucker ausfällenden organischen Flüssigkeit, indem sich nur flockig

[1]) *R. Stutzer*, Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerind. 34, 87, 1884

[2]) Nach Versuchen von *C. Neuberg* und *M. Kobel* ergibt sich folgendes Eine gesättigte methylalkoholische Barytlösung ist etwa 1,1 n.; 1 Mol Baryt fällt 1 Mol. Rohrzucker augenblicklich und quantitativ aus. Da Verfahren läßt sich auch auf andere einfache und zusammengesetzte Zucke anwenden und ist deshalb der Beachtung wert, da es bei bestimmter Hand habung mit Pyridinlösungen von Kohlenhydraten ebenfalls durchführbar ist Man kann zudem durch Behandlung der rein wässrigen Lösungen mi Barytwasser zuvor manche Beimengungen beseitigen. Über diese Ver hältnisse wird noch zu berichten sein.

[3]) Vgl. *E. Winterstein*, H. 104, 217, 1919.

standteile in mäßiger Ausbeute abschieden. Hier aber gelangten wir gendermaßen zum Ziele. Die 9 Tage stehen gebliebene alkoholisch-therische Lösung wurde von den amorphen Abscheidungen abfiltriert; beim Verdunsten der organischen Lösungsmittel restierte ein ganz schwach gelb gefärbter Sirup, der innerhalb eines Tages von selbst istallisierte. Durch Waschen und Verreiben mit kaltem Methylalkohol wurde etwas klebrige Substanz entfernt, während Rohrzuckerkristalle in eichlicher Menge zurückblieben. Beim Umkristallisieren aus wässerigem hylalkohol erhielten wir nunmehr leicht reinen Rohrzucker.

Dies letzgenannte Vorgehen lieferte annehmbare Ausbeuten; bei r direkten Kristallisation von Rohrzucker aus der alkoholisch-therischen Lösung blieb dagegen sehr viel Saccharose in Lösung.

Daß übrigens in dem nach der Barytbehandlung gewonnenen, ch sirupförmigen Zucker (siehe S. 258) praktisch reine Saccharose rliegt, beweist das weiter unten angegebene Verhalten bei der Inversion, ie mit Salzsäure oder auch mit gereinigter Invertaselösung durch-führt werden kann; zwischen den Konstanten des Drehungsvermögens vor und nach der Hydrolyse bestand Übereinstimmung.

Im besten Falle erzielten wir einen Ertrag von 8,5 g kristallisiertem Rohrzucker bei polarimetrischer Feststellung von 10,64 g Rohrzucker aus 58,5 g enzymatisch hydrolysiertem Natrium-saccharophosphat, was eine Ausbeute von 24,8 Proz. bedeutet.

Diese und ähnliche Versuche lehren, daß durch tierisches Organ-ferment eine Dephosphorylierung der Saccharo-phosphate unter Er-haltung des Rohrzuckerskeletts möglich ist und daß somit dieser Abbau durch Phosphatase in Analogie tritt zum Abbau der Raffinose durch Emulsin.

---

290 g frische, fein gehackte Pferdeniere, 580 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung sowie 9 ccm Toluol wurden nach wiederholtem Umschütteln über Nacht im Eisschrank aufbewahrt; am nächsten Morgen wurde scharf zentri-fugiert. Die erhaltene Enzymlösung (570 ccm) wurde so lange mit n/10 NaOH und n/10 HCl versetzt, bis ein p_H von 7,3 erreicht war. (Das p_H wurde an kleinen Proben nach Koagulieren in siedendem Wasserbade kolorimetrisch gemessen. Zur Erreichung der gewünschten H-Ionenkonzentration war ein Überschuß von 36 ccm n/10 NaOH erforderlich.) Das Gesamtvolumen betrug zum Schluß 640 ccm.

Mit dieser Fermentlösung wurden folgende zwei Ansätze gemacht:

a) 570 ccm Fermentlösung,
 13 g Natrium-saccharophosphat [1]),
 6 ccm Toluol.

---

[1]) Hier ist, wie in allen Fällen, lufttrockenes Salz verwendet, das 90 Proz. wasserfreie Substanz enthielt. Das Molekulargewicht des Natrium-salzes ($C_{12}H_{21}O_{14}Na_2P$) ist 466, das des Calciumsalzes ($C_{12}H_{21}O_{14}CaP$) ist 460 (beide wasserfrei).

Die Flüssigkeit enthielt also 2,05 Proz. rohrzucker-phosphorsa Natrium.

b) 50,0 ccm Fermentlösung,
0,5 „ Toluol.

Beide in Glasstöpselflaschen befindlichen Gemische wurden in ei Brutschrank von 37° gebracht; an den folgenden Tagen wurden die gespaltenen Phosphorsäuremengen in beiden Proben ermittelt. In je Falle wurden 5,0 ccm entnommen, mit 5,0 ccm dest. Wasser verdünnt 5 Minuten in siedendem Wasserbade koaguliert. Nach Filtration wu zu je 5,0 ccm Filtrat 5,0 ccm Magnesiamischung gegeben. Es zeigte schon nach einem Tage ein deutlicher Unterschied im Gehalt an fre Phosphat, der in der folgenden Zeit noch ausgeprägter wurde. N einer Woche wurde eine quantitative Phosphorsäurebestimmung du geführt. Zu diesem Zwecke wurden von den Ansätzen je 25,0 ccm 10 Minu lang im siedenden Wasserbade erwärmt, filtriert und je 10,0 ccm des Filt mit gleichen Mengen Magnesiamixtur gefällt. Die Niederschläge wur schließlich als $Mg_2P_2O_7$ zur Wägung gebracht.

0,0350 g $Mg_2P_2O_7$ wurden in 10,0 ccm Filtrat des Hauptansa gefunden. Für 100 ccm macht das 0,3500 g aus.

0,0101 g $Mg_2P_2O_7$ wurden aus 10,0 ccm entsprechendem Filtrat v Kontrollansatz erhalten, für 100 ccm also 0,1010 g.

Der Überschuß des im Hauptansatz vorhandenen $Mg_2P_2O_7$ gegenü der Kontrolle betrug somit 0,2490 g $Mg_2P_2O_7$. Der Gesamt-P_2O_5-Gel von 100 ccm einer 2,05proz. Natrium-saccharophosphat-lösung bezif sich, in $Mg_2P_2O_7$ ausgedrückt, auf 0,4896 g. Der Überschuß von 0,24 im Hauptansatz zeigt an, daß 50,9 Proz. des Saccharophosphats dephosp ryliert waren. Nach einer Woche wurde die P-Bestimmung wiederl und eine Spaltung von 59,3 Proz. des Ausgangsmaterials konstatiert.

Die Produkte der enzymatischen Hydrolyse wurden nun auf Ro zucker verarbeitet. 500 ccm des schwach alkalisch reagierenden Gemisc kamen für 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad. Nach Filtration wu der Filterrückstand einmal mit Wasser ausgekocht. Die vereinigten Filt wurden im *Faust-Heim*schen Verdunstungskasten zur Trockne eingedam Die Masse wurde dann siebenmal mit absolutem Alkohol durch Verrei unter Hinzufügen von jedesmal 1 ccm Wasser extrahiert. Die alkoholisc Auszüge wurden filtriert und die Filtrate im Vakuum bei 40° zum Si eingeengt. Dieser wurde darauf viermal unter Hinzufügen von jew 1 ccm Wasser mit je 100 ccm siedendem absolutem Äthylalkohol ausgezog wobei kein nennenswerter Rückstand blieb. Die vereinigten filtrie Lösungen ließen wir nach Zugabe von 150 ccm Äther über Nacht steh Nachdem am nächsten Morgen von einem flockigen Niederschlage abfiltr worden war, wurde wiederum im Vakuum bei 40° eingeengt. Die eingedic Masse wurde nunmehr mit siedendem Methylalkohol aufgenommen u die Lösung nach dem Erkalten so lange mit gesättigtem methylalko lischem Baryt versetzt, bis auf weitere Zugabe keine Fällung mehr entsta Das Gemenge wurde über Nacht im Eisschrank aufgehoben. Am ande Morgen wurde abgenutscht und der mit Methylalkohol gewaschene fe Rückstand in Wasser suspendiert. Nach Einleiten von Kohlendioxyd zum Verschwinden der alkalischen Reaktion wurde aufgekocht, filtri mit H_2O ausgewaschen und das Filtrat auf dem Wasserbade zu Si konzentriert. Die Lösung dieses Sirups in rund 300 ccm heißem Meth

kohol wurde nach dem Abkühlen mit absolutem Äther versetzt, bis die leichte Trübung auftrat. Daraufhin wurde die in einem Glasstöpselgefäß befindliche Mischung in den Eisschrank gestellt. Da sich am nächsten Tage nur ein geringer kristallinischer weißer Niederschlag gebildet hatte, so wurde noch etwas reiner Äther hinzugefügt. Während zweiwöchiger Aufbewahrung bei Winterkälte nahm der Niederschlag noch zu; er wurde abfiltriert und in wenig Wasser gelöst. Diese Lösung wurde vorsichtig auf dem Wasserbade eingedampft und in einen Exsikkator gestellt. Beim Umrühren trat bald Kristallisation ein. Die Kristalle wurden mit wenig Methylalkohol angerieben, abgenutscht und mit Holzgeist ausgewaschen. Die Probe mit Fehlingscher Mischung fiel erst nach dem Kochen mit HCl positiv aus; die Resorcinreaktion war stark, Phosphor in minimalster Spur nachweisbar. Ausbeute: 1,035 g.

Polarisation: 0,2442 g Substanz wurden in 5,0 ccm Wasser gelöst und im 79,5-mm-Rohr polarisiert.

In einem Prozente Traubenzucker anzeigenden Apparat wurden +2,35 Proz. abgelesen; das entspricht bei einer Rohrlänge von 79,5 mm 4,70 Proz. Rohrzucker, während die Lösung der Einwage nach 4,88 proz. war.

Inversion: 4,0 ccm der nicht reduzierenden Flüssigkeit wurden durch 1,0 ccm gereinigter Invertaselösung fast augenblicklich gespalten.

In analoger Weise wurde ein anderer Versuch vorgenommen.

65 g Natrium-saccharophosphat (= 58,5 g wasserfreies Salz),
1300 ccm Fermentsaft aus Pferdenieren,
13 ,, Toluol.
$p_H = 7,3$.

Gleichzeitig wurde eine Lösung von 2,5 g rohrzucker-phosphorsaurem Natrium in 50 ccm 0,85proz. NaCl-Lösung, die durch n/10 NaOH auf $p_H = 7,3$ gebracht war, unter Zugabe von 0,5 ccm Toluol in den Brutschrank gestellt, um zu sehen, ob bei dieser Reaktion eine unspezifische Abspaltung von Na_2HPO_4 einträte. Proben mit Magnesiamischung zu verschiedenen Zeiten und auch am Tage der Aufarbeitung des Hauptansatzes fielen stets negativ aus.

Nachdem dieser Ansatz 2 Wochen im Thermostaten gestanden hatte, wurde eine Bestimmung der noch in organischer Bindung vorhandenen Phosphorsäure ausgeführt. 20,0 ccm des Gemisches plus 20,0 ccm destillierten Wassers wurden 10 Minuten im siedenden Wasserbade koaguliert und dann filtriert. Zweimal je 15,0 ccm des Filtrats wurden mit je 20,0 ccm Magnesiamixtur versetzt, um anorganisches Phosphat zu entfernen; die Mischungen wurden auf ein Volumen von 50,0 ccm gebracht und nach 2 Stunden filtriert. Je 25,0 ccm (= 3,75 ccm der Urlösung) wurden mit Soda-Salpeter in einer Platinschale verascht, zweimal mit Salpetersäure abgeraucht und zweimal als Molybdat niedergeschlagen; dann wurde über die Magnesiafällung $Mg_2P_2O_7$ erzeugt. Dabei wurden 0,0190 bzw. 0,0192 g $Mg_2P_2O_7$ gefunden. Wenn 0,0191 g $Mg_2P_2O_7$ aus 3,75 ccm entstehen, so entspricht dies 0,5093 g in 100,0 ccm Urlösung. Da der Ansatz 4,5 Proz. saccharosephosphorsaures Natrium enthielt, kommen auf 100 ccm an organisch gebundenem Phosphor, in $Mg_2P_2O_7$ ausgedrückt, 1,0747 g. Weil wir

0,5093 g $Mg_2P_2O_7$ für organisch gebundenen Phosphor ermittelt habe so sind 47,4 Proz. des Saccharophosphats noch nicht abgebaut (unt der Annahme, daß organisch gebundener Phosphor lediglich in Gesta von Saccharophosphat vorhanden ist).

Nach einem Monat wurde der Ansatz verarbeitet. Das Gemisch wur 20 Minuten in siedendem Wasserbade koaguliert und abgenutscht, d Rückstand zweimal mit je 300 ccm Wasser ausgekocht. Die vereinigte im Vakuum zu Sirup eingeengten Filtrate wurden dreimal mit je 500 cc heißen Alkohols extrahiert; dabei wurde beim zweiten- und drittenm der Rückstand zunächst mit je 10 ccm Wasser durchfeuchtet.

Alle drei neutral reagierenden Alkoholauszüge wurden sodann verein und bei 40° im Vakuum eingeengt; der entstandene Sirup wurde siebenm mit je 250 ccm heißen Alkohols ausgezogen, nachdem das Unlösliche vor jed Extraktion mit 2,5 ccm Wasser versetzt worden war. Es hinterblieb dann e nach Kochen mit Salzsäure *Fehling*sche Mischung kaum reduzierender Rüc stand. Die vereinigten Alkoholextrakte wurden über Nacht im Eisschran aufbewahrt. Vom Ausgefallenen wurde abgenutscht. (Die hygroskopisch Ausscheidung reduzierte *Fehling*sche Lösung direkt nur schwach, nac Behandlung mit HCl kräftiger und ergab dann mit stark salpetersaur Molybdän-mischung einen mäßigen Niederschlag.) Der aus dem Filtr durch Einengen im Vakuum erhaltene Rückstand löste sich in 250 cc siedenden Methylalkohols und kam unter Zusatz von weiteren 100 cc absoluten Methylalkohols in den Eisschrank. Nach zwei Tagen fande sich am Boden des Glasstöpselgefäßes einige größere Kristalle vor, währen die überstehende Lösung klar war.

Der Rückstand, der bei der dreimaligen Extraktion mit Alkohol ge blieben war, wurde noch fünfmal nach Anfeuchten mit je 10 ccm Wasse mit je einem halben Liter siedenden Methylalkohols extrahiert. (De letzte Auszug enthielt nach Kochen mit HCl immer noch ein wenig Fehling sche Lösung reduzierende Substanz.) Diese fünf heiß filtrierten Auszüg wurden im Vakuum eingeengt. Das Residuum wurde fünfmal mit 250 cc reinen heißen Holzgeistes extrahiert. Diese Methylalkoholauszüge wurde wieder zu Sirup eingedampft und abermals mit je 250 ccm Methylalkoh ausgekocht. Nachdem vom über Nacht Ausgefallenen abfiltriert wa wurde diese Fraktion mit dem im Eisschrank aufbewahrt gewesenen methy alkoholischen Extrakt vermengt. Die vereinigten Flüssigkeiten wurden nu mehr mit etwa 400 ccm gesättigter methylalkoholischer Barytlösun versetzt, wobei eine dicke weiße Fällung erfolgte. Nach 24stündige Verbleiben im Eisschrank wurde der Niederschlag abgesaugt, zweim mit Methylalkohol ausgewaschen, in 250 ccm Wasser suspendiert und m CO_2 anfangs in der Kälte, später in der Wärme behandelt. Dann wurd filtriert, ausgewaschen und die klare Lösung auf dem Wasserbade zu Siru eingeengt.

Als dieser nach längerem Stehen im Exsikkator glasig erstarrt wa wurde er in 200,0 ccm Wasser gelöst. Im 1-dm-Rohr betrug in eine Apparat, der für 2-dm-Röhren direkt Prozente Traubenzucker anzeig die *Drehung* + 3,35 Proz. Daraus berechnet sich der Rohrzuckergeha nach der Formel: $\frac{2 . 3,35}{1,26} = 5,32$ Proz.

Somit lag eine 5,32proz. Rohrzuckerlösung vor; in den 200,0 ccm waren demnach 10,64 g Saccharose vorhanden.

Zur *Inversion* wurden 20,0 ccm mit 1,5 ccm rauchender Salzsäure *Clerget-Herzfeld* invertiert und aufgefüllt auf 25,0 ccm. Die Drehung -dm-Rohr entsprach dann — 0,95 Proz. Glucose bei 0°. Daraus ergibt unter Berücksichtigung der Verdünnung, der Gehalt an Invertzucker prechend — 0,95 . 2 . 5/4 = — 2,37 Proz. Glucose.

Da nun die spezifischen Drehungen von Rohrzucker und Invertzucker im hältnis von 100 : 42 bei 0° stehen, so berechnet sich aus der polarimetrisch ndenen Zahl von 5,32 Proz. Rohrzucker das Invertzuckeräquivalent h dem Ansatz: $\frac{100}{5,32} = \frac{42}{x}$ zu 2,23, während 2,37 nach der Inversion ächlich gefunden worden sind.

Die Flüssigkeit, in der also eine schon ziemlich reine Rohrzuckerlösung lag, wurde erneut im Vakuum eingeengt und der hinterbliebene Sirup 500 ccm heißen Methylalkohols unter Zusatz von 10 ccm Wasser gelöst. r Methylalkoholauszug wurde nach dem Filtrieren mit Äther bis zur nenden Trübung versetzt und in den Eisschrank gestellt. Im Verlauf 9 Tagen bildeten sich einige wenige größere Kristalle. Weil aber die stallisation nicht fortschritt, so wurde das Holzgeist-Äther-Gemisch im uum abgedunstet. Nach wenigen Tagen hatte sich dann aus dem Sirup Kristallbrei gebildet, der mit etwas Methylalkohol angerieben, abutscht und zweimal mit Methylalkohol nachgewaschen wurde. Auste 8,5 g kristallinische Substanz. Eine Lösung derselben reduzierte lische Kupfermischung direkt nicht, wohl aber stark nach Hydrolyse ch heiße Salzsäure; ein Phosphorgehalt war nicht mehr zu erkennen. weiteren Reinigung wurden 4 g der Kristalle in 4 ccm heißem Wasser st und mit 28 ccm siedendem Alkohol versetzt. Die warm filtrierte ung schied innerhalb eines Tages reichlich Kristalle aus, die abgenutscht zweimal mit Alkohol gewaschen wurden. Diese Umkristallisation de nochmals wiederholt und die so gewonnene Substanz im Hochuum bei 98° getrocknet.

Polarisation: 0,6271 g, gelöst mit Wasser zu 10,0 ccm, wiesen im 2-dmr im Prozente Traubenzucker anzeigenden Apparat eine Ablenkung entechend + 7,87 Proz. Glucose auf. Daraus berechnen sich (durch Division 1,26) 6,25 Proz. Rohrzucker, während der Einwage nach eine 6,27proz. charoselösung vorlag.

Die spezifische Drehung ergibt sich aus dem gefundenen Werte zu 66,52°, nach der Formel $[\alpha]_{D_{18}} = \frac{100 . a}{1 . c}$, wobei $a = + 7,87 \times$ dem Umhnungsfaktor 1,06 ist.

Drei weitere Versuche wurden mit Calcium-saccharophosphat als bstrat angestellt. Als Enzymmaterial diente einmal Nierensaft vom = 7,3, dann Nierenbrei unter Zusatz von $CaCO_3$ und schließlich solcher ne Calciumcarbonat. Bei dem Saftversuch war bemerkenswert[1]), daß r gesamte Ansatz nach eintägigem Verweilen im Thermostaten infolge spaltung von gallertigem Calciumphosphat gelatinös erstarrt war. Er urde nach 3 Wochen, innerhalb deren aus der Gallerte wieder Wasser gepreßt war, aufgearbeitet, während die beiden anderen Versuche

[1]) Vgl. *C. Neuberg* und *K. Djenab* sowie *M. Tomita*, l. c.

erst nach 2 Monaten abgeschlossen wurden. Die Aufarbeitung untersch
sich im wesentlichen nicht von der oben ausführlich geschilderten.
dem Saftversuch wurden Kristalle erhalten, die einwandfrei als Rohrzuc
identifiziert werden konnten. Bei diesen Versuchen mit Organbrei durf
wir uns mit der Aufarbeitung bis zu weitgehend gereinigten Rohrzuck
sirupen begnügen; wir führten den Nachweis für das Vorliegen von Ro
zucker durch Inversion mit Saccharase (bei Abwesenheit jeder Spur
Ausgangsmaterials, d. h. bei Fehlen von Phosphor) sowie polarimetris
indem wir den Rohrzuckergehalt aus den Drehwerten vor und nach
Inversion mit Salzsäure bestimmten und innerhalb der zulässigen
weichungen einander entsprechend fanden.

Berichtigung.

In der Arbeit von *W. Sauer*, diese Zeitschr. **168**, **336**, **1926**, m
es heißen:

$$\sigma_t = \sigma_0 (1 - \gamma t)$$

$\gamma = \pm 0{,}003$

statt

$$\sigma_t = \sigma_0 (1 - \gamma t)\, \gamma = \pm 0{,}003.$$

Zur Kenntnis des Jods als biogenes Element.

Von

B. Bleyer.

…m chemischen Institut der Hochschule für Landwirtschaft und Brauerei in Weihenstephan.)

…imentell mitbearbeitet von *Beatr. Osborne* und *Jul. Schwaibold.*)

(Eingegangen am 30. Januar 1926.)

…erorts ergeben sich aus der durch die Ionenlehre angebahnten …dierten Betrachtung der Wirkungsweise anorganischer Stoffe …kenntnisse, die über die lange Zeit hindurch übliche biochemische …tung organischer Stoffe hinausführen. Man erkennt immer … daß neben den durch ihre Menge imponierenden Verbindungen …triums, Kaliums, Magnesiums, Calciums, Chlors, Phosphors, … auch noch andere Elemente dazu beitragen, regelmäßige und … auch wichtige Bausteine der lebenden Substanz zu liefern: Aluminium, Zinn, Kupfer, Silicium, Arsen, Schwefel, Quecksilber, …n, Fluor, Brom, Jod, vermutlich auch noch Vanadium, Strontium, …Selen u. a. Es ist zu erwarten, daß in Bälde, sowie es mit der …ung des allgemeinen Begriffes „Eiweiß“ in ernährungsphysio… … differenzierte Bausteine gegangen ist, der allgemeine Begriff …neralischen Stoffwechsels eine weitergehende Differenzierung …n, als er es jetzt schon aufweist, wenn man es nur einmal gelernt …einen und kleinsten Mengen von analytisch jetzt zum Teil noch … zugänglichen anorganischen Stoffen nachzugehen.

…an wird vielleicht eine derartige Mehrung der Erkenntnisse fürs …ar nicht so sehr wünschen wollen, weil die Übersichtlichkeit …erschwert wird. Eine derartige Befürchtung ist durchaus an…icht, denn jeder, der sich mit der Auffindung und Bestimmung …r und kleinster Mengen anorganischer Bestandteile in biogenem …ial befaßt hat, weiß, wie schwer es ist, bei der Fülle der Lebens…mungen, bei der Fülle der in wünschenswerter Weise der Unter…ung zuzuführenden Stoffe die schwache Spur nicht zu verlieren … die Bemühungen der an sich zeitraubenden Beobachtungen nicht …zetteln.

Man ist also gezwungen, sich vorerst künstliche Grenzen zu ziehe die ein Gebiet umschließen, in dem man dann wenigstens zu eine einigermaßen abschließenden Teilergebnis zu gelangen hofft.

In den letzten Jahren hat man mancherorts das Jod als biogen Element studiert.

Dies wurde in erster Linie verursacht durch die Aufdeckung der Ro des Jods bei der Pathogenese des Kropfes und seiner Folgeerscheinunge Ohne zu einem abschließenden Urteil kommen zu wollen, daß Jodmang in der Nahrung und Umwelt die alleinige Ursache der Vergrößerung d Schilddrüse sei, hat man doch wohl nach jetzt allgemein geltender A schauung die Überzeugung gewonnen, daß Jodmangel wenigstens zu d nicht nebensächlichen Gründen des Kropfes gehört, und daß es desha notwendig sei, festzustellen, was Jodmangel" sei, wie das Jod, element und in Verbindungen, in der Natur verbreitet sei und dergleichen. *Hunzik Eggenberger*, *v. Fellenberg* sind in der Schweiz vorgegangen, andere si nachgefolgt. Es liegt also schon jetzt eine stattliche Reihe von Veröffen lichungen vor, die sich mit dem Vorkommen des Jods im allgemeinen u im besonderen befassen.

Für den einzelnen ist es sehr schwer, vorwärts zu kommen, wenn ma sich nicht eine ganz bestimmte Fragestellung zurecht legt. Erwünscl wäre es aber, in größerem Zusammenhang über das Schicksal des Jods i natürlichen Kreislauf etwas zu erfahren, da ja doch, wenn man von mensch lichen Verhältnissen absieht, der Jodumlauf im Menschen in engster Al hängigkeit steht zu den Ereignissen des Jodumlaufs im Boden, im Wasse in der Luft, in der Nahrung.

Eine derartig erweiterte Fragestellung, die sich aber immer noch eng Begrenzung gefallen lassen muß, mit einiger Aussicht auf Erfolg zu be arbeiten, erscheint nur durch Zusammenarbeiten mehrerer in enger Be rührung stehender Stellen möglich. Es war deshalb zu begrüßen, daß sic ein derartiger Versuchsring bilden ließ, in dem nach einheitlichen Gesicht punkten mit der „Jodfrage" zusammenhängende Einzelgebiete der *Boden kunde*, *Pflanzen-* und *Tierernährung* durch das agrikulturchemische In stitut Weihenstephan (Vorstand Prof. Dr. *Niklas*), die *Milchproduktio* und *Milchbewertung* durch die Süddeutsche Forschungsanstalt für Milch wirtschaft in Weihenstephan (Vorstand Landwirtschaftsminister Prof. *Fehr* beide unter Mitwirkung des Chemischen Instituts in Weihenstephan (Vor stand Prof. Dr. *Bleyer*) zur Bearbeitung kommen sollen. Eine wesentlich Ergänzung werden diese Arbeiten durch die Weiterführung in der Klini haben: Ernährung mit „jodreichen" und „jodarmen" Nahrungsstoffen mit Milch von „jodfreien" und „jodreichen" Tieren und dergleichen; dies Beobachtungen werden in der Universitäts-Kinderpoliklinik Münche (Vorstand Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *C. Seitz*) durchgeführt werden.

Derartige Untersuchungen können vielleicht eine besondere Ergänzun zu den Arbeiten der Schweizerischen Autoren bilden. In der Schwei liegen die Verhältnisse des natürlichen Jodumlaufs und seiner Rück wirkungen auf Mensch und Tier sicher wieder anders als bei uns in Süd bayern, und andere Verhältnisse sind wahrscheinlich wieder in den Niede rungsgebieten zu erwarten. Zwischen der Schweiz, dem Gebirgsland mi starker Auslaugung der Böschungen durch ablaufendes Wasser und de Niederung, in der sich die allmählich mit Jodiden anreichernden Gewässe stauen, liegt unser bayerisches Gebiet; zwischen den mutmaßlich relativ

„jodhungrigen" Lebewesen des Hochlandes und den „jodgesättigten" Lebewesen des Tieflandes liegt unser Übergangsgebiet. Infolge der wechselnden Faktoren ist die Beobachtung sicher nicht erleichtert, um so weniger ist Verallgemeinerung einzelner Beobachtungen am Platze, die unter anderen Bedingungen zustande kamen.

Das Programm, das in Angriff genommen wurde, läßt sich in großen Zügen folgendermaßen umschreiben.

A. *Übersicht und Kritik der bisher im Schrifttum vorgeschlagenen Verfahren zur Bestimmung kleinster Jodmengen.*

B. *Zur vorläufigen Orientierung aus praktischem Interesse.*

a) Serie von ständig in der menschlichen Ernährung benutzten Bodenprodukten aus einem „Kropfbezirk" Bayerns; Jodgehalt.

b) Serie von ständig in der menschlichen Ernährung benutzten Bodenprodukten aus einem relativ kropffreien Bezirk Bayerns; Jodgehalt.

c) Serie aus einem relativ kropffreien Bezirk Außerbayerns mit anderen klimatischen und bodenartlichen Bedingungen wie b); Jodgehalt.

d) Gelegentlich aufgefallene zur Ernährung dienende Bodenprodukte, dem freien Markt mit verschiedener Beschickung und ohne Herkunftsmerkmale entnommen; Jodgehalt.

e) Einige Bodenuntersuchungen; Auswahl typischer Bodenarten verschiedener geologischer Zugehörigkeit, verschiedener Struktur.

f) Einige Trinkwasseruntersuchungen.

C. *Weitergehende Untersuchungen.*

a) *Boden.* Untersuchung verschiedener Böden nach den gewöhnlichen Methoden, Bestimmung des Fe- und Mn-Gehalts, der Wasserstoffionenkonzentration, des Gehalts an organischen Stoffen, des Jodabspaltungsvermögens. Zusammenhang des Jodgehalts der Böden mit dem Katalasegehalt.

Was geht in diesen Böden mit dem zugesetzten anorganischen Jod vor sich? Wieviel davon entweicht in die Luft, wieviel geht in organische Bindung über, wird also an Düng- und Humusstoffe gebunden? Wieviel wird durch den Regen (oder bei Versuchen in geschützter Lage durch Bewässerung) herausgewaschen. Wie schnell erfolgt die Abnahme des zugesetzten anorganischen Jods?

Wasserlösliches und wasserunlösliches (K_2CO_3-lösliches) Jod.

Die Art der Bindung des Jods im Boden.

Die Wirkung von Düngemitteln auf das „Jodschicksal" der Böden.

b) *Kulturversuche.* Wieviel Jod nimmt die eine oder andere Pflanze unter wechselnden, natürlichen Bedingungen aus dem Boden auf?

Welche Rolle spielt dabei die Düngung mit natürlichem oder küns lichem Dünger?

c) *Untersuchung des Pflanzenmaterials.* In welchen Formen komn das Jod in den Pflanzen vor (anorganisch, an Fett gebunden, an ande Stoffe gebunden, an Eiweiß, Chlorophyll usw.)?

d) *Abtransport des Jods aus dem festen Lande.* Jodgehalt vo Flüssen zu verschiedenen Jahreszeiten am Oberlauf, Mittellauf, Unte lauf; Schätzung auf Grund der Wasserführung.

e) *Erweiterte Trink- und Nutzwasseruntersuchungen.* Auswahl nac geologischen Gesichtspunkten.

f) *Luft und Niederschlagswasser* unter verschiedenen meteorol gischen Bedingungen.

g) *Verwertung im Tierkörper.* Nicht nach pharmakologische Gesichtspunkten, sondern vom Standpunkt der Tierzüchter und Tie halter aus. Einfluß auf Milchsekretion, Geschlechtstätigkeit, Wachstum Habitus, Haarkleid und andere äußere Merkmale; sind für den Tie züchter erkennbare Nebenwirkungen vorhanden? Weshalb nimm der Jodgehalt der Schilddrüse der Haustiere im Laufe des Winters ab Wird das dadurch mitveranlaßt, daß die Futterstoffe (Heu usw. beim Lagern durch Vergröberung des kolloiden Zustandes bei an sich gleichbleibendem Gesamtjodgehalt ihr Jod schwerer abgeben? Oder bleibt die Jodabgabe gleich und nimmt ein anderer Faktor ab (z. B Besonnung, Belichtung).

Lassen sich an kropffreien Inseln innerhalb von Kropfgebieten besondere Merkmale hinsichtlich Jodbewirtschaftung an Mensch, Tie und Pflanze erkennen (Ausscheidung, relative Trockenheit der Luft Besonnung usw.).

Die einzelnen Veröffentlichungen werden in zwangloser Reihen folge und ohne Anhalt an die Programmfolge erscheinen.

Zur anderweitigen Orientierung sei auch noch besonders auf die Reihe der Veröffentlichungen von *Fellenberg*[1]), *Mac Clendon*[2]), *D. Marine* und auf die neuerlichen Arbeiten von *O. Stiner*[3]), *Schröder*[4]), *W. Ost*[5]) hin

[1]) *Fellenberg*, zum Teil mit Mitarbeitern, diese Zeitschr., Jahrg. 1923 bis 1925; auch erschienen in Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebens- mitteluntersuchung und Hygiene. Bern 1923 bis 1925.

[2]) *Mac Clendon*, Journ. of Amer. Med. Anoc. 80, 600, 1923; 82, 1668, 1924.

[3]) *O. Stiner*, Schweiz. med. Wochenschr. 1925, Nr. 29; Münch. med. Wochenschr. 1925, S. 1537.

[4]) *Schröder*, Zeitschr. f. angew. Bot. 7, 9, 1925.

[5]) *Ost*, Zentralbl. f. Kunstdüngerindustrie 31, 1, 1926.

gewiesen. Diese Publikationen behandeln grundsätzliche allgemeine Fragen. Über die Auswirkung der „Jodfrage“ auf das medizinische Gebiet sind in den letzten Jahren zahlreiche Arbeiten erschienen (*Eggenberger*, *Hunziker*, *Roux*, *Bayard*, *Klinger*, *Bischer*, *Veil*, *Sturm* und *Maurer* u. a.), von denen besonders auf die von *Eggenberger* und *Hunziker*[1]) hingewiesen werden möge, die weiteres Schrifttum nachweisen. Die Aufführung der vorgenannten Arbeiten kann bei der Fülle der vielen Publikationen nicht erschöpfend sein.

A. Übersicht und Kritik der im Schrifttum vorgeschlagenen Verfahren zur Bestimmung kleinster Jodmengen.

Die meisten der bekannt gewordenen Methoden gehen auf die Angaben von *Rabourdin*[2]) zurück (Veraschung der organischen Substanz, Überführung des Jodids der Asche in elementares Jod und Nachweis dieses durch Ausschütteln). An diesen grundsätzlichen Methoden wurde von späteren Autoren wenig geändert; durch Verfeinerung konnte die Genauigkeit allmählich erheblich verbessert werden. Die größte Steigerung der Genauigkeit wurde schließlich durch *L. Winkler* und *Th. v. Fellenberg*[3]) erzielt. Andere Wege, wie die maßanalytische Methode von *Blum* und *Grützner*[4]), die gravimetrischen Methoden von *Pregl-Lieb*[5]), *Baubigny-Chavanue*[6]), fußend auf der Methode von *Carius*, müßten noch fortgebildet werden, um an die Ergebnisse der *Fellenberg*schen Methodik heranzukommen.

Besondere Wege haben einige amerikanische Autoren eingeschlagen: *Krauss*[7]) extrahiert das Jodid der Asche mit Alkohol und sucht es dann durch Überführung mit Palladiumchlorür in schwarzbraunes Palladiumjodür kolorimetrisch zu bestimmen. Diese Methode hätte einige grundsätzliche Vorzüge; leider ist sie vom Autor nicht so weit ausgebildet worden, um ohne allzu große Schwierigkeiten auch für notwendige minimetrische Bestimmungen herangezogen zu werden. Da wir die vom Autor in Aussicht gestellten weiteren Veröffentlichungen, die wahrscheinlich diese Voraussetzungen schaffen sollten, nicht ausfindig machen konnten, haben wir es selbst unternommen, zu untersuchen, ob bei der Wahrung der Vorzüge (Extraktion des Aschenjodids = Zeitersparnis) die Genauigkeit entsprechend weit getrieben werden kann.

Die Schwierigkeit liegt in der Schwerlöslichkeit des Palladiumjodürs, weshalb nephelometrische Endbestimmung notwendig ist. Die Versuche sind noch im Gange, es wird gesondert darüber berichtet.

Vorläufig kann aber mit Sicherheit gesagt werden, daß die nephelometrische Bestimmung gegenüber der kolorimetrischen Mikrobestimmung

---

[1]) *Hunziker* und *Eggenberger*, Die Prophylaxis der großen Schilddrüse. Bern und Leipzig 1924.
[2]) *Rabourdin*, Liebigs Ann. **76**, 375, 1850.
[3]) *Fellenberg*, diese Zeitschr. **139**, 371, 1923.
[4]) *Blum* und *Grützner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 427, 1913; **91**, 392, 1914.
[5]) *Lieb*, Abderhaldens Handbuch, 2. Aufl., Abt. I, Teil 3, S. 476.
[6]) *Baubigny-Chavanue*, C. r. **136**, 1197, 1903; **138**, 85, 1904.
[7]) *Krauss*, Journ. of biol. Chem. **22**, 151, 1925.

nach *Fellenberg* keine Vorteile bringen wird, selbst bei gleicher Genauigke beider Methoden fällt die umständliche Handhabung eines teuren Mikr nephelometers sehr ins Gewicht.

Das *Kendall*sche Verfahren[1]) bietet nach unserer Erfahrung keir methodischen Vorteile; wir haben es wieder verlassen.

Das gleiche gilt auch von dem Verfahren von *Mac Clendon*[2]), da den Vorteil bietet, der peniblen, zeitraubenden und Geschicklichkeit e fordernden Veraschung aus dem Wege zu gehen: In besonderen Quar rohren wird aus der Substanz im Sauerstoffstrom elementares Jod au getrieben und in einer Vorlage aufgefangen. Abgesehen von den teure Quarzrohren, gelang es nur selten bei eigenen Versuchen, die Oxydatio so zu leiten, daß die Vorlage frei blieb von teerigen Schwefelprodukter die dann doch eine erneute umständliche Weiterverarbeitung des Inhal der Vorlage notwendig machten. Wir haben uns nach den gemachten Er fahrungen ganz auf die *Fellenberg*sche Methode gestützt, die wir eine sehr genauen Kritik unterwarfen. Wir versetzten beispielsweise Blutkohl von vorher bestimmtem Jodgehalt mit wechselnden Mikromengen vo Jodiden, wir behandelten ganz besonders schwierig zu veraschende Stoffe wie fettreiche, zuckerreiche Kondensmilch in ähnlicher Weise; wir fande die notwendige besondere Vorübung und Erfahrung, die notwendige Vor bereitung der Reagenzien und Geräte und des Arbeitsraumes vorausgesetzt immer die gesuchten Jodmengen. Das erschien uns überraschend, denn wir erwarteten nicht, daß in verhältnismäßig großen Mengen organische Substanz, die sorgfältig vernichtet werden muß, noch Mengen von 1 Millionstel Gramm Jod gefunden und einwandfrei bestimmt werden können. Wir können die *Fellenberg*sche Methode in allen Einzelheiten bestätigen. Einzelheiten darüber sind in angegebenen Veröffentlichungen des Autors und bei *Veil* und *Sturm*[3]) nachzulesen.

Ba, Bb, Bc, Bd.

Ba: *Serie von Dietmannsried* im Bayerischen Allgäu, subalpine Gegend mit viel Niederschlägen, Diluvium, zum Teil moorig; Kropfgegend. Bodenerzeugnisse *eines* Produzenten, größtenteils durch Herrn Dr. *Streng*, praktischer Arzt in Dietmannsried, zu gleicher Zeit entnommen, Sommer 1924.

Bb: *Serie von Oggersheim in der Pfalz.* Niederungsgegend mit wenig Niederschlägen, Alluvium. Bodenerzeugnisse *eines* Produzenten; zu gleicher Zeit entnommen, Sommer 1924.

Bc: *Serie von Eddelack in Holstein.* Marine Gegend mit viel Niederschlägen, Marschboden. Bodenerzeugnisse *eines* Produzenten; zu gleicher Zeit entnommen, Sommer 1924.

Bd: *Serie vom Münchener Markt* und dem Münchener Handel entnommen zu verschiedenen Zeiten 1924 und 1925; Herkunft sehr wechselnd, zum Teil nicht festzustellen.

---

[1]) *Kendall*, Journ. of biol. Chem. **43**, 161, 1920.

[2]) *Mac Clendon*, Journ. of Amer. Med. Anoc. **80**, 600, 1923; **82**, 1668, 1924.

[3]) *Veil* und *Sturm*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **147**, 166. 1925.

Tabelle I.

γ = die jetzt übliche Bezeichnung für 1 Millionstel Gramm.

Bezeichnung	Ba: Dittmannsried γ Jod in 1 kg	Bb: Oggersheim γ Jod in 1 kg	Bc: Eddelack γ Jod in 1 kg	Bd: München γ Jod in 1 kg
er, frisch gelegt . .	54	65	140	sehr wechselnd, 108 i. kg, 175 i. kg, 404 i. kg, 330 i. kg
genmehl	85	120	130	115
zenmehl	93	95	142	78
enbrot	76	102	—	82, 87
brot	70	115	—	75, 92
offel	20	34	32	28
t (Kopfsalat) . .	5	50	49 (Wirsing)	62
(Birnen) . . .	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	20	4, 8, 17
h gemähtes Gras i 1924)	72	—	—	54
aus dem gleichen s	304	56 (Heu d. Gegend)	—	220
ches Fleisch — Kalbfleisch	25 (aus dem Ort)	—	—	34, 38, 30 (v. einem Niederbayer. Tier)
senfleisch	30 (aus dem Ort)	—	—	35, 40, 32
rst	12, 16, 10 (aus dem Ort)	18, 21, 24 (aus dem Ort)	—	12, 22, 18
erkraut	nicht nachweisbar	—	—	4, 8, 6 (v. Ismanning)
dermehl	40 (aus d. Handel)	—	—	44 (aus d. Handel)
rgarine	65 (aus d. Handel)	70 (aus d. Handel)	—	83 (aus d. Handel)
hweinefett	110 (aus d. Handel)	120 (aus d. Handel)	115 (aus d. Handel)	115 (aus d. Handel)
Kochsalz	35 (bayer. Siedesalz)	25 (Steinsalz unbekannter Herkunft)	kein Jod (Steinsalz)	33, 38 (bayer. Siedesalz)
Trinkwasser	1,2 (Trinkwasser des Hofes	—	—	—
„ Ortsleitung	1,5	—	—	1,2*)
„ Ortsbrunnen	2,3	—	—	—
Milch	30	—	—	38
Reife Hartkäse . . .	80 (aus dem Ort)	—	—	92, 116 (aus d. Handel)
„ Magerkäse . .	57 (aus dem Ort)	—	—	60, 74 (aus d. Handel)
Butter	50 (aus dem Ort)	63 (aus dem Ort)	—	62 (aus d. Handel)
Bier	4 (auswärts)	—	—	4, 5,2, 6, 6,2 (versch. Münchn. Brauereien)
Wein (Traubenwein)	15 (Pfälzer)	18, 16, 19 (Pfälzer)	—	18—22 (Pfälz. u. Tiroler)
Forelle (im ganzen) .	—	—	—	48 (Markt)
Schellfisch (i. ganzen)	—	—	—	78 (Markt)

*) Über das Münchener Trinkwasser siehe später.

Zum Vergleich.

Getrocknetor Seetang aus Japan (in Japan als tägliches Gemüse gegessen)	650 000 γ/kg
Getrockneter Seetang aus der Nordsee . . .	480 000 „
Badeschwamm neu	2 700 000 bis 3 200 000 „

Bemerkung zu Tabelle I.

Ohne daß derartige Serien durch mehrere Jahre hindurch möglic vollständig untersucht werden, läßt sich natürlich nichts Endgültiges sag Man müßte aber die Untersuchungen möglichst jeweils an Ort und St machen: Probeentnahme, Versand, Konservierung usw. sind sonst schwierig, abgesehen davon, daß der Versand mancher Dinge gar ni so ohne weiteres möglich ist.

Es läßt sich aber schon aus den vorstehenden Angaben ohne Zw erkennen, daß wahrscheinlich ein deutlicher Unterschied in dem dur schnittlichen Gesamtjodgehalt gleicher Nahrungsmittel aus verschieder Gegenden besteht, die sich auch medizinalstatistisch hinsichtlich Kro häufigkeit unterscheiden.

Hier könnte noch bemerkt werden, daß die gewöhnlichen Sorten v *Siedesalz* (Kochsalz aus Sole gewonnen) an sich geringe Jodmengen, dur schnittlich 30 γ/kg, enthalten; die üblichen norddeutschen Steinsalzsort sind praktisch jodfrei. Unter anderem:

Bayerisches Siedesalz (Reichenhall)	30 bis 37 γ/kg
Berchtesgadener Sole (August 1924)	445 „
Reichenhaller Quellsole (Edelsole, August 1924)	334 „
Steinsalz Bartensleben	5 „
Badesalz I Bad Nauheim	1200 „
Badesalz II Bad Nauheim	300 „

B e. Bodenuntersuchungen.

Methode nach *Fellenberg*[1]).

Boden durch Haarsieb von 0,75 mm Maschenweite sieben und n das feine Material verwenden. 5, 10, 15, 20 bis 30 g des so vorbereitet Materials mit verdünnter HCl (1 : 1) übergießen und mehrere Stunden la stehenlassen unter öfterem Umrühren; dann mit reichlich Wasser verdünne zentrifugieren, filtrieren. Rückstand trocknen, lufttrocken wägen = *sal säureunlöslicher Anteil*; darin Jodbestimmung; im *salzsäurelöslichen Ant* ebenfalls Jodbestimmung.

Weitergehende eigene Versuche, den Jodanteil der Böden auf ei „schonende" Weise zu mobilisieren, etwa durch Citratlösungen od schwache Citronensäurelösungen, wie sie bei den P-Bestimmungen üblic ist, führten vorläufig zu keinem brauchbaren Ergebnis. Von einer Angab wird deshalb abgesehen. Es besteht ein Bedürfnis, zu einer Vereinbarungs methode zu gelangen, um einheitlich zu einer Anschauung über den Gesamt jodgehalt und das für die Pflanzen zugängliche Jod im Boden zu gelange

---

[1]) *Th. v. Fellenberg*, Mitt. a. d. Geb. d. Lebensmittelunters. u. Hyg. 15 239, 1924.

Die Aufschmelzmethoden und Aufschließmethoden mit HCl lassen noch keinen Schluß für das „Nahrungsjod" zu. Derartige Arbeiten sind im Gange.

Der Jodgehalt ist in γ-Prozenten angegeben.

Tabelle II.

Nr.	Boden-Nr.	Geologische Zugehörigkeit	Bodenart	Einsender	Reaktion p_H (KCl-Auszug)	Jodgehalt a) HCl-löslich (γ-Proz.)	Jodgehalt b) HCl-unlöslich (γ-Proz.)	Jodgehalt Summe (γ-Proz.)
1	325	Burgsandstein	S	Landw. Heeresfachschule Nürnberg	5,7	Spuren	Spuren	
2	683	Blasensandstein	sSLLs	Gunzenhausen	6,85	20	70	90
3	706	Granit	sŠL	Landw.-Stelle Passau	4,7—4,8	35	380	415
4	708	Granit	SsL	Landw.-Stelle Passau	5,0	Spuren	Spuren	
5	714	Glimmerschiefer	sSL	Landw.-Stelle Passau	5,75	10	95	105
6	744	Urgebirge	ȞĽS	Landw.-Stelle Kemnath	4,7	3	13	16
7	879	Diluvialsand	LHS	Landw.-Stelle Altdorf bei Nbg.	6,6	15	242	257
8	786	Muschelkalk	HsL	Landw.-Stelle Uffenheim	6,81	33	242	275
9	1023	Gipskeuper	sT	Landw.-Stelle Ansbach	6,8	13	190	203
10	910	Albüberdeckung	šL	Hofgut Kathariedl Beratzhausen	6,4	Spuren	210	210
11	—	Niederungsmoor	—	Hofgut Vötting	—	220	560	780
12	—	Niederterrassenschotter	HLS	Hollern II	6,5	57	545	602
13	2246	Hochmoor	H	Landw.-Stelle Kaufbeuren	7,0	Spuren	933	933
14	2248	Hochmoor	H	Landw.-Stelle Kaufbeuren	6,55	50	800	850
15	4178		H Moorboden	Landw.-Stelle Nördlingen	7,15	105	276	381

Bemerkungen. Bodenartbezeichnung: H = Humus, L = Lehm, S = gröbere Sande, s = feinere Sande, z. B. HSL = humoser grobsandiger Lehm.

Bemerkung zu Tabelle II.

Es handelt sich durchweg um landwirtschaftlich benutzte Böden. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß es bei derartigen Untersuchungen nicht ohne weiteres angängig ist, aus einer Gegend einen beliebigen Boden zu untersuchen; das würde zu keinen brauchbaren Überblicken führen, als lediglich zu dem, daß es eben nicht möglich ist, vom einzelnen auf das

Ganze zu schließen. Düngungsart (jodreicher Stallmist im Gegensatz jodfreien künstlichen Düngemitteln), Frucht, Jahreszeit, trockene oc nasse Vegetationszeit und viele andere äußere Umstände spielen allzuse herein.

Besser ist es schon, aus einer Gegend verschiedene Proben zu er nehmen und diese Serien miteinander zu vergleichen. Z. B. wurden i Zusammenhang mit der Entnahme von Bodenprodukten aus dem Kroj gebiet Dietmannsried im Allgäu und den kropffreien Gegenden von Oggei heim in der Pfalz und Eddelack in Holstein auch Bodenproben aus de Betrieb der Erzeuger der fraglichen Bodenprodukte entnommen und d Untersuchung zugeführt. Hier zeigt sich besser der Unterschied in de „Jodstandard".

Bezeichnend ist der relativ hohe Jodgehalt mooriger Böden, die e fahrungsgemäß stark adsorptiv wirken und auch im allgemeinen wen erschöpft werden.

Tabelle III,

Dietmannsrieder Böden.

Ackerboden (Getreideboden) HSL, mittelschwer, Stallmistdüngung:

HCl-löslich	22 γ-Proz.
HCl-unlöslich	54 „
	76 γ-Proz.
Wiesenboden HSL, Gülledüngung	112 γ-Proz.
Moorboden, nicht gedüngt	589 „

(in Moorböden erfahrungsgemäß starke Adsorption).

Oggersheimer Böden.

Ackerboden (Getreideboden), schwer, Stallmistdüngung und Kalidüngung, abgeerntet:

HCl-löslich	0 γ-Proz.
HCl-unlöslich	64 „
	64 γ-Proz.

Ackerboden (Zuckerrüben), leicht, Stallmist- + Ammonsulfat- + Ammonsuperphosphatdüngung:

HCl-löslich	33 γ-Proz.
HCl-unlöslich	70 „
	103 γ-Proz.

Ackerboden (Kartoffel), mittelschwer, Stallmistdüngung:

HCl-löslich	30 γ-Proz.
HCl-unlöslich	135 „
	165 γ-Proz.

Wiesenboden, nicht gedüngt:

HCl-löslich	30 γ-Proz.
HCl-unlöslich	153 „
	183 γ-Proz.

Wiesenboden, sauer, schwer, Stallmistdüngung:

HCl-löslich	28 γ-Proz.
HCl-unlöslich	252 „
	280 γ-Proz.

Wiesenboden, sauer, schwer, vorjährige Stallmistdüngung:

HCl-löslich	40 γ-Proz.
HCl-unlöslich	197 „
	237 γ-Proz.

Eddelacker Böden.

Wiesenboden, schwer, ungedüngt:

HCl-löslich	65 γ-Proz.
HCl-unlöslich	415 „
	480 γ-Proz.

Wiesenboden, schwer, ungedüngt:

HCl-löslich	60 γ-Proz.
HCl-unlöslich	393 „
	453 γ-Proz.

Wiesenboden, schwer, ungedüngt:

HCl-löslich	93 γ-Proz.
HCl-unlöslich	356 „
	449 γ-Proz.

Ackerboden, ungedüngt:

HCl-löslich	45 γ-Proz.
HCl-unlöslich	425 „
	470 γ-Proz.

Ackerboden, ungedüngt:

HCl-löslich	20 γ-Proz.
HCl-unlöslich	658 „
	678 γ-Proz.

Ackerboden, Kalkstickstoffdüngung:

HCl-löslich	27 γ-Proz.
HCl-unlöslich	201 „
	228 γ-Proz.

Böden aus der Münchener Umgebung.

Gartenboden Berg a. Laim:

HCl-löslich	40 γ-Proz.
HCl-unlöslich	53 „
	93 γ-Proz.

Wiesenboden Perlach:

HCl-löslich	29 γ-Proz.
HCl-unlöslich	130 „
	159 γ-Proz.

Bf. Einige Trinkwasseruntersuchungen.

Entnahme an den Quellen oder Brunnen, Versand in Ballons unter gabe von reinstem jodfreien (geprüft bzw. besonders gereinigt) Kali carbonat zur Erzeugung einer stark alkalischen Reaktion.

Tabelle IV.

Herkunft	Datum der Entnahme	Gehalt γ in kg
München, Städtische Wasserleitung	Frühjahr 1925	
a) in München		1,1 1,2 1,
b) am Quellschacht 4 in Gotzing		2
c) am Quellenhaus Mühltal		0,5
d) am Hauptsammelschacht Reisach		2
München, Grundwasserquellen im Stadtgebiet Pettenkofer Brunnhaus		1,4
München, Quelle der Bogenhauser Hofbrauleitung		1,4
München, Quelle der Auer Freileitung Klosterbrunnenstube Mariahilfsplatz		3
München, Grundwasserbrunnen der Spatenbrauerei (sehr tief liegend)		1,6
München, Grundwasserbrunnen der Löwenbrauerei (sehr tief liegend bis zu den marinen Schichten)		4,4
Fürth i. B.		2,6
Dietmannsried/Allgäu	1924/1925	1,2 1,5 2,3

Anhang: *Einige Mineralwasser.*

Wiessee, bei Tegernsee, Oberbayern „Jodquelle“	38700 bis 40000 γ/k
Heilbrunn, Oberbayern, „Adelheidsquelle“	23700 „ 24300 „
Krankenheil-Tölz, Oberbayern, „Jodtrinkquelle“	996 „
Meerwasser aus der Nordsee (von der Küste Helgolands)	17 „

Die Untersuchungen werden in systematischer Weise (Auswa nach geologischen Beziehungen) weitergeführt. Im allgemeinen kar gesagt werden, daß der Jodgehalt der gewöhnlichen Trinkwässer se geringfügig ist und zu dem täglichen Jodbedarf der Menschen (etw 150 bis 200 γ pro Tag, bezogen auf die „jodempfindliche“ Bevölkeru gebirgiger Gegenden) und der Tiere nur wenig beiträgt. Die im Publiku verbreitete Anschauung, daß „harte“ Wässer Kropfwässer seien, h wahrscheinlich nur indirekt eine gewisse Berechtigung, indem har Wässer vielfach aus Schichten treten, die an sich jodarm sein könne und es auch vielfach sind und damit anzeigen, daß die dortige Umwe auch relativ jodarm ist. Eine bessere Kenntnis kann erst durch wiede holte und umfassende (Härte, Abdampfrückstand usw.) Wasserunte suchungen gewonnen werden; diese sind, wie erwähnt, im Gange.

Zur Kenntnis des Jods als biogenes Element.

II. Mitteilung[1]):

Fütterungsversuch mit steigenden Jodgaben zu Milchziegen.

Von

H. Niklas, A. Strobel und K. Scharrer.

Berichterstatter: A. Strobel.

(Aus dem agrikulturchemischen Institut der Hochschule für Landwirtschaft und Brauerei Weihenstephan bei München.)

(Eingegangen am 30. Januar 1926.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Die pharmakologische Stellung des *Jods* und seiner Verbindungen ist noch nicht abschließend untersucht worden. Besonders durch die zweifelhafte Wirkung schon sehr kleiner Jodmengen sind ganz neue Gesichtspunkte zutage getreten.

Vorläufig ist man, ohne damit einer besseren Aufklärung in der ganzen Angelegenheit vorzugreifen, im allgemeinen mit der Darreichung von Jod und Jodverbindungen vorsichtig geworden und das ganz mit Recht, besonders wenn man auf die Anwendung für die Menschen Bezug nimmt, die unter Umständen ganz erheblichen Gefährdungen bei unvorsichtiger Jodbehandlung ausgesetzt sind.

Die Frage, ob die Darreichung von Jod und Jodverbindungen an Nutztiere in gleicher Weise vorsichtig zu handhaben ist, ist noch kaum angeschnitten worden. Man sollte meinen, daß auch bei den Tieren, hauptsächlich bei den häuslichen Nutztieren, grundsätzlich gleiche Voraussetzungen vorliegen. Es liegen in dieser Richtung in der Hauptsache Beobachtungen vor, ob die winzigen Jodgaben, die mit Hilfe der sogenannten „Vollsalze“ normalerweise den Haustieren verabreicht werden, schädliche oder nützliche Wirkungen z. B. auf die Milchsekretion haben. Über derartige Versuche wird an dieser Stelle später eingehend berichtet werden.

Im allgemeinen aber herrscht noch der Gedanke vor, Jod und Jodverbindungen an Haustiere in relativ „massiven“ Dosen zu geben, wenn diese nur besonders günstige Wirkungen, wie z. B. Regelung der Geschlechtstätigkeit, Verbesserung des Habitus, der Haarkleider, der

---

[1]) Vgl. *B. Bleyer*, diese Zeitschr. 1926.

Anfälligkeit gegen verschiedene verbreitete Krankheiten und d
gleichen ausüben. Allenfallsige Nebenwirkungen scheint man in K
nehmen zu wollen, falls sie nur nicht zu stark hervortreten.

Daß diese Anschauung auf die Dauer nicht haltbar ist und ei
Kritik nicht standhält, ist klar und es ist in erster Linie von
pharmakologischen Erforschung der Wirkung des Jods und sei
Verbindungen — in kleinsten bis zu großen Darreichungsmengen
zu erhoffen, daß wir einen festen Boden in der ganzen Angelegenh
erhalten.

Als Beitrag zu einer solchen pharmakologischen Studie, die nat
lich nur im Zusammenhang von berufener Seite durchgeführt werd
kann, möchten wir über Ergebnisse berichten, die bei der Verfütteru
von „massiven" Jodidmengen an milchenden Ziegen zutage trat
Der Begriff „massiv" ist auch hier nur ein relativer, von dem Stan
punkt der Erkenntnis der beachtlichen Wirkung kleinster Jodmeng
beim Menschen aus gesehen. „Massiv" sind die Dosen nicht, we
man die Versuchsanstellung an anderen Stellen dagegen hält. Es m
sein, daß bei der durchschnittlichen Kürze der Lebensdauer der häu
lichen Haustiere, vorab der Schlachttiere, und bei der Ernährungswei
Schädigungen durch Jod weniger zu befürchten sind, daß überhau
die „nervöse" Komponente der Jodwirkung, die beim Menschen s
sehr ins Gewicht fällt, bei Tieren weniger berücksichtigt zu werde
braucht, und kann sich vorläufig nur darum handeln, Beobachtunge
zu sammeln. Berufenere, als dies der praktische Tierzüchter und Tie
halter sein kann, die vorerst nur praktische Ziele im Auge haben müsse
mögen dann entscheiden, ob die „Vorsicht" in der Jodverabreichu
ganz oder teilweise auf die praktische Tierzucht und Tierhaltung z
übertragen ist.

A. Einführung in die Grundlagen der Versuchsanstellung[1]).

I. Fragestellung und Versuchsplan.

Die gesamte Anordnung der Versuche und die jeweils notwendige
Maßnahmen bauten sich auf der Fragestellung auf:

Welchen Einfluß haben steigende Jodgaben

1. auf das Verhalten und den Gesundheitszustand der Tiere,
2. auf den Milchertrag,
3. auf den Fettgehalt der Milch,
4. auf das Gewicht der Tiere,
5. auf die Geschlechtstätigkeit der Tiere.

[1]) Bezüglich der einschlägigen Literatur wird später an anderer Stell
gesondert berichtet werden.

Aus dieser Fragestellung ergab sich folgender, während der ganzen Dauer des Versuchs als zweckmäßig empfundener Versuchsplan.

Gruppe A	Grundfutter ohne Jod während der ganzen Versuchsdauer.		
Gruppe B:			
Vorperiode	Grundfutter ohne Jod		
Übergangszeit zur I. Periode	„	+ 60 mg	Jod
I. Periode	„	+ 60 „	„
Übergangszeit zur II. Periode	„	+ 120 „	„
II. Periode.	„	+ 120 „	„
Übergangszeit zur III. Periode	„	+ 180 „	„
III. Periode	„	+ 180 „	„

Der Versuch wurde demnach gleichzeitig nach dem Gruppen- und Periodensystem in der Weise angesetzt, daß von zwei Gruppen zu je fünf Tieren die eine Gruppe nur Grundfutter erhielt, während der zweiten Gruppe neben der gleichen Menge Grundfutter als Beigabe Jod in steigender Menge innerhalb gleich langer Perioden verabreicht wurde.

Jede Periode setzte sich aus einer zehntägigen Übergangszeit und einer 14tägigen eigentlichen Versuchsperiode zusammen. Auf eine Periode entfielen somit im ganzen 24 Versuchstage. Dem Versuche selbst ging eine zehntägige Vorfütterung voraus, außerdem wurden die Tiere vor dieser 13 Tage lang zusammengehalten, um sich aneinander zu gewöhnen.

Die Daten der einzelnen Versuchsabschnitte waren wie folgt festgesetzt:

Vorperiode	4. IV.	bis	13. IV.
Übergangszeit zur I. Periode	14. IV.	„	23. IV.
I. Periode	24. IV.	„	7. V.
Übergangszeit zur II. Periode	8. V.	„	17. V.
II. Periode.	18. V.	„	31. V.
Übergangszeit zur III. Periode.	1. VI.	„	10. VI.
III. Periode	11. VI.	„	24. VI.

II. Vorbereitung und Durchführung des Versuchs selbst[1]).

1. Die Art der Tiere.

Die Tiere wurden im Monat März käuflich erworben und im Lehrstall der Süddeutschen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft untergebracht. Hinsichtlich der Rassenzugehörigkeit ist zu bemerken, daß sämtliche Tiere Kreuzungsprodukte der verschiedensten Rassen darstellten. Die Einteilung der Tiere in die beiden Gruppen mit und ohne Jod wurde am 7. April in der Weise vorgenommen, daß sich am gleichen Platz jeder Gruppe ein Tier mit annähernd gleichem Milchertrag gegenüberstand. Eine gleichzeitige Übereinstimmung des Gewichtes der Tiere in dieser Reihenfolge konnte nicht erreicht werden. Das Ergebnis dieser Gruppierung vom 7. April 1925 zeigt Tabelle I.

[1]) An der Durchführung des Versuchs hat *W. Schropp*-Weihenstephan in dankenswerter Weise mitgearbeitet.

Tabelle I.

Einteilung der Tiere in die beiden Versuchsgruppen am 7. April 1925.

Nr.	Tier Nr.	Milchertrag am 7. IV. g	Gewicht am 3. IV. g
		Gruppe A ohne Jod.	
1	I	2500	35,5
2	V	1850	40,0
3	IV	1700	31,0
4	III	1500	37,0
5	IX •	1300	26,0
Durchschnitt		1770	33,9
		Gruppe B mit Jod.	
1	VII	2350	30,0
2	VI	1950	41,0
3	X	1650	30,0
4	XII	1400	30,0
5	IX	1150	32,0
Durchschnitt		1700	32,6

Die Angaben über das Alter, die Lammzeit, die Anzahl der Lämm sowie eine kurze Beschreibung der Tiere sind, soweit ermittelbar, in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle II.

Nr.	Tier Nr.	Alter des Tieres	Gelammt am	Stückzahl	Abgesetzt am	Gekauft am	Beschreibung des Tieres
				Gruppe A ohne Jod.			
1	I	2 Jahre	22. III.	2	3. IV.	25. III.	Weiß, kurzhaarig, gehör
2	V	4 „	13. III.	2	2. IV.	18. III.	Weiß, langhaarig, gehör
3	IV	3 „	Ende Febr.	2	—	31. III.	Weiß, kraushaarig, gehörnt
4	III	2 „	Anfang März	1	—	23. III.	Weiß, kurzhaarig, g hörnt, verkümmer Ohren
5	XI	2 „	14. III.	1	2. IV.	18. III.	Braun, weiß gefleckt, u gehörnt, sehr klein
				Gruppe B mit Jod.			
1	VII	2 Jahre	19. III.	2	2. IV.	25. III.	Grau, gehörnt, klein
2	VI	5 „	Ende Febr.	2	—	20. III.	Weißgrau, kurzhaar ungehörnt, Hinterha Durchtritt
3	X	2 „	„ „	1	—	18. III.	Rehfarbig, langhaarig, u gehörnt
4	XII	3 „	19. III.	2	4. IV.	20. III.	Weiß, ungehörnt
5	IX	2 „	21. III.	1	3. IV.	25. III.	Schwarz, ungehörnt

2. Das Versuchsfutter.

Das Grundfutter wurde sämtlichen Tieren gleichmäßig verabreich und betrug pro Kopf und Tag 1½ kg Heu, 0,75 g Kleie, 0,5 kg Kartoffe und 0,25 kg Erdnußkuchen. Ferner erhielt jedes Tier pro Tag 10 g Sal und 5 g phosphorsauren Kalk in Form von Dicalciumphosphat mit 34,45 proz P_2O_5.

Tränkwasser wurde den Tieren nach jeder Mahlzeit ohne Beschränkung r Menge gereicht.

An Heu stand solches von mittelmäßiger bis geringer Qualität, legunosenarm, an Kleie gute Weizenkleie und Kartoffel von kleiner Größe d geringer Qualität zur Verfügung. Der von der Bayerischen Warenmittlung landwirtschaftlicher Genossenschaften A.-G., München, geierte Erdnußkuchen hatte eine hellgraue Farbe, typischen Erdnußgeruch d -geschmack und einen sehr hohen Fettgehalt. Kleie und Erdnußkuchen rden von der Abteilung für Futtermittelkontrolle der Bayerischen desanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz auf Reinheit und Frische tersucht. Die Untersuchung der Kleie ergab: „Reine Spelzweizenkleie, ter Frische“, die des Erdnußkuchens: „Reiner Erdnußkuchen (nicht r 2 Proz. gemahlener Hülsen), vorzüglicher Frische“ (rohfaserarm).

Kartoffel, Kleie und Erdnußkuchen wurden jeweils für eine Mahlzeit r sämtliche Tiere zusammen abgewogen und die Gesamtmenge auf die zelnen Tiere gleichmäßig verteilt. Das Heu wurde in Bündel von je kg abgewogen und jede Mahlzeit den Tieren ein Bündel lang verabreicht. füttert wurde täglich dreimal, und zwar 7 Uhr morgens, ½12 Uhr mittags d 5 Uhr nachmittags. Für die Morgen- und Abendfütterung wurden die Kleie und der 12 Stunden vorher eingeweichte Erdnußkuchen mit warmem Wasser zu einem dicken Brei angemacht, mittags wurden Kartoffeln und Kleie trocken gefüttert.

Die Futtermenge war so bemessen, daß die Tiere über die Sättigung raus noch Futter aufnehmen konnten. Im allgemeinen nahmen die Tiere s Futter gut an. Daß die Futterration tatsächlich höher war, als zur llständigen Sättigung nötig gewesen wäre, mag der Umstand beweisen, ß die Tiere nie vollständig auffraßen.

Das Jod wurde den Tieren als Natriumjodid, Na J, in Tablettenrm gegeben. Die Tabletten hatten nachstehende Zusammensetzung:

I. Gabe (60 mg Jod): 70 mg Na J = 60 mg Jod, 6 mg Natriumcarbonat, 33 mg Kochsalz fein zerrieben, Milchzucker und Maisstärke w. Talkum bis zum Gesamtgewicht einer Tablette von 0,7 g.

II. Gabe (120 mg Jod): 140 mg Na J = 120 mg Jod, 12 mg Natriumcarbonat, 33 mg Kochsalz fein zerrieben, Milchzucker und Maisstärke w. Talkum bis zum Tablettengewicht von 0,7 g.

III. Gabe (180 mg Jod): 212 mg Na J = 180 mg J, 18 mg Natriumcarbonat, 33 mg Kochsalz fein zerrieben, Milchzucker und Maisstärke w. Talkum bis zum Tablettengewicht von 0,7 g.

Die Tabletten wurden den Tieren der Gruppe B jeweils morgens Uhr nach der Fütterung mittels eines sogenannten „Einschütts“ verbreicht, d. h. in eine Saugflasche wurde etwas Wasser, vermischt mit Milch, die Jodtablette gegeben und diese den Tieren eingeschüttet. Dadurch rde erreicht, daß die Tabletten möglichst ungekaut in den Magen der ere gelangten. Die Beigabe des Kochsalzes zu der Tablettenmasse hatte n Zweck, die große Vorliebe der Ziegen für Salz zur besseren Annahme r Tabletten zu benutzen. In einigen Fällen, bei denen das Einschütten cht völlig gelang, bewährte sich diese Maßnahme. Bei Beginn der Jodabe leisteten die Tiere beim Einschütten etwas Widerstand, gewöhnten ch aber nach einigen Tagen so daran, daß sie die Flasche von selbst annahmen.

3. Untersuchungen und Wägungen.

Von den Futtermitteln wurden nur Kleie und Erdnußkuchen a Reinheit und Frische untersucht. Der Milchertrag jeden Tieres wur bei jedem Morgen- und Abendgemelk gewichtsmäßig festgestellt. Die Fe gehaltsbestimmung der Milch konnte aus technischen Gründen erst ab 8. M dem Beginn der Übergangszeit zur zweiten Periode, erfolgen. Sie wur durch das Milchwirtschaftliche Institut von Morgen- und Abendgem jedes Tieres gesondert vorgenommen. Die Wägungen der Tiere wurden Abständen von 10 bis 12 Tagen, jeweils zwischen 10 bis 11 Uhr vormitta die Messung der Körpertemperatur der Tiere jeden Tag in der Zeit v ½5 bis ½6 Uhr nachmittags, also zur Zeit des Temperaturmaximun im Mastdarm vorgenommen. Ab 27. Mai wurden von den einzelnen Tier Milchproben (Morgen- und Abendmilch gemischt) genommen und z chemischen Untersuchung (Bestimmung des Jodgehalts) weitergeleit

B. Die Versuchsergebnisse.

I. Der Einfluß der jeweiligen Jodgabe auf das Verhalten und den Gesundhei zustand der Tiere.

Seit Beginn der Jodgaben zeigte sich bei den Tieren der Gruppe keinerlei Unterschied hinsichtlich Verhalten und Gesundheitszusta gegenüber dem in der Zeit ohne Jodgabe. Die jeweiligen Jodgab wurden von den Tieren ohne Schwierigkeiten aufgenommen.

Die seit 22. April (Ende der Übergangszeit zur ersten Period täglich vorgenommenen Messungen der Körpertemperatur jedes ei zelnen Tieres hatten folgendes Ergebnis:

1. Vergleich der Durchschnitte von Gruppe A und B innerhal der einzelnen Versuchsabschnitte.

Von der Vorperiode liegen keine Messungen vor, von der Übergang zeit zur ersten Periode sind nur zwei Tagesmessungen vorhande sie wurden mit denen der ersten Periode verrechnet.

I. Periode:

Gruppe A	39,34° C	
„ B	39,46° C	+ 0,12° C

Übergangszeit zur II. Periode:

Gruppe A	39,54° C	
„ B	39,71° C	+ 0,17° C

II. Periode:

Gruppe A	39,35° C	
„ B	39,63° C	+ 0,28° C

Übergangszeit zur III. Periode:

Gruppe A	39,55° C	
„ B	39,63° C	+ 0,08° C

III. Periode:

Gruppe A	39,30° C	
„ B	39,53° C	+ 0,23° C

2. Die Einzeldurchschnitte der Tiere während der jeweiligen Versuchsperioden sind aus nachstehender Tabelle III ersichtlich.

Tabelle III.

Nr.	Tier Nr. und Gruppe	Vorfütterung	Übergangszeit zur I. Periode	I. Periode	Übergangszeit zur II. Periode	II. Periode	Übergangszeit zur III. Periode	III. Periode
				Gruppe A ohne Jod.				
1	I	—	—	39,45	39,47	39,21	39,37	39,33
2	V	—	—	39,52	39,58	39,63	39,64	39,41
3	IV	—	—	39,26	39,91	39,18	39,35	39,30
4	III	—	—	39,19	39,18	39,21	39,73	39,09
5	XI	—	—	39,28	39,59	39,52	39,69	39,40
				Gruppe B mit Jod.				
1	VII	—	—	39,44	39,64	39,66	39,65	39,41
2	VI	—	—	39,43	39,71	39,68	39,46	39,52
3	X	—	—	39,67	39,95	39,95	39,93	39,71
4	XII	—	—	39,48	39,63	39,60	39,70	39,56
5	IX	—	—	39,30	39,66	39,47	39,44	39,45

Wie aus den beiden vorliegenden Aufstellungen zu entnehmen ist, überschreiten die Durchschnitte der Temperaturen sowohl der beiden Gruppen als auch der einzelnen Tiere in keinem Falle die Normaltemperatur, die bei Ziegen 39,0 bis 40,5° C beträgt. Die Durchschnitte der Temperaturen von Gruppe B sind in allen Versuchsabschnitten, von denen Messungen vorliegen, um ein Geringes höher als die von Gruppe A.

II. Der Einfluß der jeweiligen Jodgaben auf den Milchertrag.

1. Feststellungen während der einzelnen Perioden.

Der tägliche Durchschnitt der 10 Tage jedes einzelnen Tieres, die höchste und niedrigste tägliche Milchmenge sowie die gesamte und die durchschnittliche Schwankung sind jeweils für Gruppe A in den Tabellen IVa bis Xa, für Gruppe B in den Tabellen IVb bis Xb zusammengestellt.

a) Vorfütterung.

Die Vorfütterung begann bei beiden Gruppen am 4. April 1925 vormittags und endigte nach zehntägiger Dauer am 13. April 1925 abends. Der Gesamtmilchertrag in der Vorfütterung betrug bei Gruppe A 76,10 kg, der Durchschnitt der 10 Tage 7,61 kg, bei Gruppe B 77,85 bzw. 7,78 kg.

Tabelle IVa. Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 10 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Durchschn von 10 Tagen g
1	I	2185	7. IV.	2500	10. IV.	1800	700	70
2	V	1725	5. IV., 12. IV.	1900	10. IV., 13. IV.	1500	400	40
3	IV	1275	7. IV., 8. IV.	1700	10. IV.	700	1000	100
4	III	1245	7. IV.	1500	13. IV.	1000	500	50
5	XI	1180	4. IV., 7. IV.	1300	11. IV.	1050	250	25
Durchschnitt der 5 Tiere		1522	—	1780	—	1210	570	57

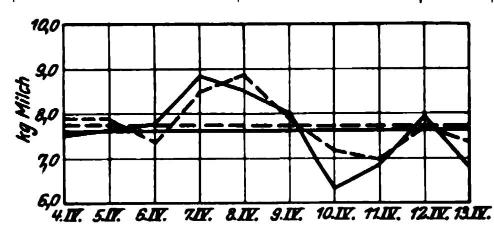


Abb. 1. Gruppe A: ——— (ohne Jod), Gruppe B: - - - - - (mit Jod). In den Kurven sind die Milcherträge je Tag, in den Linien die Durchschnitte der Versuchszeit zum Ausdruck gebracht. Zahlen hierzu siehe Anhang.

Tabelle IVb. Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 10 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Durchschn. von 10 Tagen g
1	VII	2115	8. IV.	2500	11. IV.	1700	800	80
2	VI	1675	8. IV.	2100	9. IV., 10. IV., 11. IV.	1400	700	70
3	X	1565	4. IV.	1700	11. IV., 13. IV.	1400	300	30
4	XII	1280	7. IV.	1400	4. IV., 6. IV., 11. IV., 13. IV.	1200	200	20
5	IX	1150	8. IV.	1400	4. IV., 6. IV., 12. IV.	1000	400	40
Durchschnitt der 5 Tiere		1557	—	1820	—	1340	480	48

Der Milchertrag von Gruppe B hatte somit im Durchschnitt der 10 Tage eine Erhöhung um 0,17 kg oder 2,18 Proz. gegenüber der von Gruppe A erfahren.

b) Übergangszeit zur ersten Periode.

Sie wurde am 14. April 1925 mit der Morgenfütterung begonnen und am 23. April 1925 mit der Abendfütterung beendet. Das Grundfutter war bei beiden Gruppen gleich, Gruppe B erhielt außerdem 60 mg Jod je Tier und Tag.

Der gesamte Milchertrag während der Übergangszeit zur ersten Periode war 74,75 kg, der tägliche Durchschnitt 7,48 kg bei Gruppe A und 81,20 kg oder 8,12 kg Durchschnitt bei Gruppe B.

Tabelle Va. Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 10 Tagen	Höchste tägliche Milchmenge		Niedrigste tägliche Milchmenge		Schwankung der Milchmenge	
		g	am	g	am	g	Gesamt g	Durchschn. von 10 Tagen g
1	I	2335	19. IV.	2600	14. IV.	1950	650	65
2	V	1670	19. IV.	1900	14.IV., 15.IV., 16. IV.	1500	400	40
3	IV	1245	18.IV., 22.IV. 23. IV.	1400	14. IV.	1000	400	40
4	III	1030	18. IV.	1200	15. IV.	900	300	30
5	XI	1195	20. IV.	1400	15.IV., 16.IV.	1000	400	40
Durchschnitt der 5 Tiere		1495	—	1700	—	1270	430	43

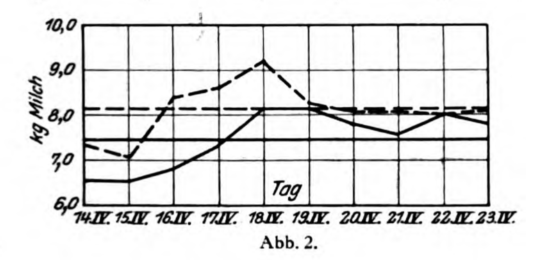


Abb. 2.

Tabelle Vb. Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 10 Tagen	Höchste tägliche Milchmenge		Niedrigste tägliche Milchmenge		Schwankung der Milchmenge	
		g	am	g	am	g	Gesamt g	Durchschn. von 10 Tagen g
1	VII	1930	18. IV.	2200	21.IV., 22.IV.	1700	500	50
2	VI	2110	18.IV., 20.IV.	2400	14.IV., 15.IV.	1700	700	70
3	X	1575	16.IV., 17.IV., 18.IV., 22. IV.	1700	15. IV.	1300	400	40
4	XII	1280	18. IV.	1500	20. IV.	1000	500	50
5	IX	1225	18. IV.	1400	15. IV.	900	500	50
Durchschnitt der 5 Tiere		1624	—	1840	—	1320	520	52

Der Milchertrag der Gruppe B war im Durchschnitt dieser 10 Tage um 0,64 kg oder 7,88 Proz. höher als der von Gruppe A.

c) Erste Periode.

Beginn am 24. April 1925 mit der Morgenfütterung, Ende am 7. Mai 1925 mit der Abendfütterung. Die Grundfutterration war bei

beiden Gruppen gleich, in Gruppe B erhielt jedes Tier außerdem n
60 mg Jod pro Tag.

Der Gesamtmilchertrag während der ersten Periode belief sich
Gruppe A auf 106,35 kg, der tägliche Durchschnitt dieser 14 Tage
7,60 kg, bei Gruppe B auf 107,95 bzw. 7,71 kg.

Tabelle VIa. Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	g	Schwankung d Milchmenge Gesamt g	Durchsc von 14 Ta g
1	I	2407	25. IV.	2600	3. V.	2100	500	36
2	V	1703	25. V.	2000	5. V., 6. V.	1500	500	36
3	IV	1282	24. IV., 25. IV., 26. IV., 2. V.	1400	27. IV., 6. V.	1300	100	7
4	III	896	24. IV., 27. IV.	1100	5. V., 6. V.	700	400	29
5	XI	1307	24. IV., 25. IV., 27. IV., 30. IV., 2. V., 3. V., 7. V.	1400	26. IV., 28. IV., 29. IV., 1. V., 4. V., 6. V.	1200	200	14
Durchschnitt der 5 Tiere		1519	—	1700	—	1360	340	24

Abb. 3.

Tabelle VIb. Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Durchschn von 14 Tage g
1	III	1696	24. IV., 25. IV.	2000	5. V.	1400	600	43
2	VI	1996	26. IV.	2200	3. V., 4. V.	1800	400	29
3	X	1510	27. IV.	1700	3. V., 6. V.	1300	400	29
4	XII	1253	2. V.	1400	6. V.	1100	300	22
5	IX	1253	24. IV.	1300	6. V.	1150	100	11
Durchschnitt der 5 Tiere		1542	—	1720	—	1350	370	26

Der Milchertrag von Gruppe B war im Durchschnitt der 14 Tage
um 0,11 kg oder 1,42 Proz. höher als der von Gruppe A.

d) Übergangszeit zur zweiten Periode.

Sie fing an am 8. Mai 1925 mit der Morgenfütterung und endigte
am 17. Mai 1925 mit der Abendfütterung. Das Grundfutter war bei

beiden Gruppen gleich, in Gruppe B bekam außerdem jedes Tier pro Tag 120 mg Jod.

Die Gesamtmilchmenge in diesem Untersuchungsabschnitt betrug bei Gruppe A 73,00 kg, welcher ein Durchschnittswert pro Tag von 7,30 kg gleichkommt, bei Gruppe B 78,05 bzw. 7,81 kg.

Tabelle VIIa. Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge		Niedrigste tägliche Milchmenge		Schwankung der Milchmenge	
			am	g	am	g	Gesamt g	Durchschn. von 14 Tagen g
1	I	2325	10. V., 15. V.	2500	11. V.	2000	500	50
2	V	1680	10. V.	1900	11. V.	1400	500	50
3	IV	1140	9. V.	1650	11. V.	450	1200	120
4	III	775	8. V., 9. V., 10. V., 17. V.	900	12. V.	700	200	20
5	XI	1380	13. V.	1500	9. V., 11. V.	1300	200	20
Durchschnitt der 5 Tiere		1460	—	1690	—	1170	520	52

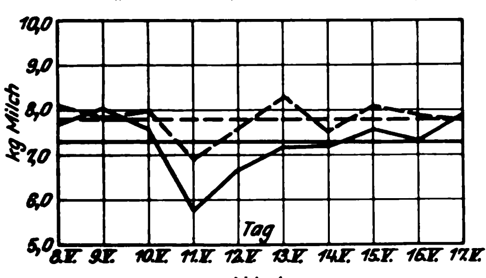


Abb. 4.

Tabelle VIIb. Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge		Niedrigste tägliche Milchmenge		Schwankung der Milchmenge	
			am	g	am	g	Gesamt g	Durchschn. von 14 Tagen g
1	VII	1570	9. V.	1800	14. V.	1300	500	50
2	VI	1970	8. V.	2200	11. V.	1700	500	50
3	X	1675	15. V.	1800	11. V.	1400	400	40
4	XII	1390	13. V., 15. V.	1500	17. V.	1200	300	30
5	IX	1200	17. V.	1400	11. V.	1000	400	40
Durchschnitt der 5 Tiere		1561	—	1740	—	1320	420	42

Der Milchertrag von Gruppe B war in diesem Versuchsabschnitt um durchschnittlich 0,51 g oder 6,52 Proz. größer als der von Gruppe A.

e) *Zweite Periode.*

Mit dieser wurde am 18. Mai 1925 morgens begonnen. Das Grun futter war bei allen Tieren gleich, in Gruppe B bekam jedes Tier auße dem noch 120 mg Jod pro Tag.

Der Milchertrag belief sich insgesamt bei Gruppe A auf 108,50 k bei Gruppe B auf 102,65 kg, der tägliche Durchschnitt dieser 14 Ta auf 7,33 bzw. 7,75 kg.

Tabelle VIIIa. Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	Höchste tägliche Milchmenge g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	Niedrigste tägliche Milchmenge g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Schwankung der Milchmenge Durchsch von 14 Tag g
1	I	2311	21. V.	2500	25. V.	2000	500	35
2	V	1589	21. V. 31. V.	1800	25. V. 27. V.	1400	400	28
3	IV	1268	29. V. 31. V.	1600	22. V.	800	800	57
4	III	836	28. V. 29. V. 31. V.	1000	23. V.	650	350	25
5	VI	1328	21. V.	1600	24. V.	1000	600	43
Durchschnitt der 5 Tiere		1466	—	1700	—	1170	530	38

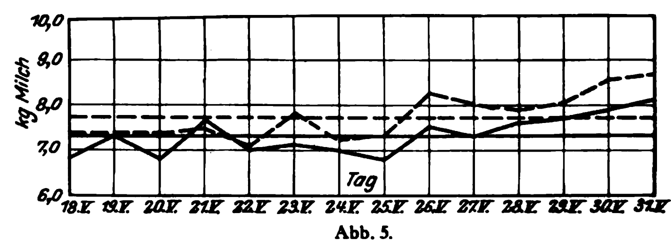


Abb. 5.

Tabelle VIIIb. Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	Höchste tägliche Milchmenge g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	Niedrigste tägliche Milchmenge g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Schwankung der Milchmenge Durchschn. von 14 Tagen g
1	VII	1386	27. V. 31. V.	1600	25. V.	1050	550	39
2	VI	1900	31. V.	2200	18. V.	1500	700	50
3	X	1729	29. V. 30. V. 31. V.	1900	24. V.	1400	500	36
4	XII	1532	30. V. 31. V.	1700	19. V. 20. V.	1400	300	21
5	IX	1203	30. V.	1400	22. V.	1000	400	28
Durchschnitt der 5 Tiere		1550	—	1760	—	1270	490	35

Der Milchertrag der Gruppe B war im Durchschnitt der
Tage um 0,42 kg oder 5,41 Proz. größer als der von
ruppe A.

f) Übergangszeit zur dritten Periode.

Anfang am 1. Juni 1925, Ende am 10. Juni 1925. Das
rundfutter war bei beiden Gruppen wiederum gleich, die
iere der Gruppe B erhielten außerdem 180 mg Jod pro Kopf
nd Tag.

Die gesamte Milchmenge ergab 76,85 kg, der tägliche Durch-
chnitt der 10 Tage 7,69 kg bei Gruppe A, bei Gruppe B 85,95
zw. 8,60 kg.

Tabelle IX a.

Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 10 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	Höchste tägliche Milchmenge g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	Niedrigste tägliche Milchmenge g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Schwankung der Milchmenge Durchschn. von 10 Tagen g
1	I	2340	1. VI. 6. VI. 7. VI. 9. VI. 10. VI.	2400	8. VI.	2200	200	20
2	V	1710	9. VI.	1900	1. VI. 2. VI. 3. VI. 6. VI.	1600	300	30
3	IV	1525	9. VI.	1700	8. VI.	1300	400	40
4	III	855	9. VI. 10. VI.	1000	5. VI. 6. VI.	700	300	30
5	XI	1255	7. VI.	1400	5. VI.	1100	300	30
Durchschnitt der 5 Tiere		1537	—	1680	—	1380	300	30

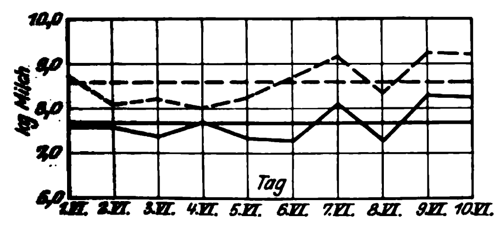


Abb. 6.

Tabelle IXb. Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 10 Tagen	Höchste tägliche Milchmenge		Niedrigste tägliche Milchmenge		Schwankung der Milchmenge	
		g	am	g	am	g	Gesamt g	Durchschn. von 10 Tagen g
1	VII	1765	10. VI.	2100	4. VI.	1500	600	60
2	VI	2080	9. VI.	2300	8. VI.	1800	500	50
3	X	1725	7. VI.	1850	2. VI. 6. VI.	1600	250	25
4	XII	1670	7. VI. 10. VI.	1800	2. VI.	1500	300	30
5	IX	1355	7. VI. 9. VI.	1500	1. VI.	1200	300	30
Durchschnitt der 5 Tiere		1719	—	1910	—	1520	390	39

Der Milchertrag von Gruppe B war in der Übergangszeit zur dritten Periode um 0,91 kg oder 10,58 Proz. größer als der von Gruppe A.

g) Dritte Periode.

Diese Periode begann am 11. Juni 1925 vormittags und endigte am 24. Juni 1925 abends. Beide Gruppen erhielten das gleiche Grundfutter, in Gruppe B bekam dazu jedes Tier pro Tag 180 mg Jod.

Tabelle Xa. Gruppe A.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen	Höchste tägliche Milchmenge		Niedrigste tägliche Milchmenge		Schwankung der Milchmenge	
		g	am	g	am	g	Gesamt g	Durchschn. von 14 Tagen g
1	I	2450	21. VI.	2700	13. VI.	2100	600	42
2	V	1853	11. VI. 20. VI. 21. VI.	2000	13. VI.	1700	300	21
3	IV	1593	21. VI.	1900	12. VI.	1300	600	43
4	III	1118	23. VI.	1400	13. VI.	700	700	50
5	XI	1428	24. VI.	1600	12. VI.	1200	400	28
Durchschnitt der 5 Tiere		1688	—	1920	—	1400	520	37

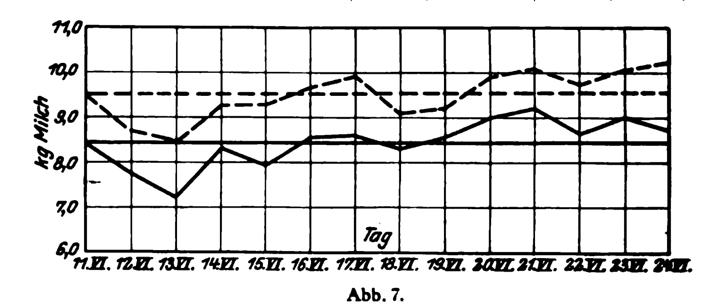


Abb. 7.

Die Gesamterzeugung an Milch belief sich bei Gruppe A auf 8,20 kg, was einem täglichen Durchschnitt von 8,44 kg gleichkommt. i Gruppe B betrug der Gesamtmilchertrag 133,30 kg, der Durchhnitt 9,52 kg.

Tabelle Xb.

Gruppe B.

Nr.	Tier Nr.	Täglicher Durchschnitt von 14 Tagen g	Höchste tägliche Milchmenge am	Höchste tägliche Milchmenge g	Niedrigste tägliche Milchmenge am	Niedrigste tägliche Milchmenge g	Schwankung der Milchmenge Gesamt g	Schwankung der Milchmenge Durchschn. von 14 Tagen g
1	VII	2016	17. VI.	2300	13. VI.	1800	500	35
2	VI	2225	16. VI.	2450	13. VI.	1900	550	39
3	X	1832	11. VI. 21. VI.	2000	13. VI.	1700	300	21
4	XII	1921	20. VI. 23. VI. 24. VI.	2100	12. VI. 13. VI.	1700	400	29
5	IX	1525	23. VI.	1800	15. VI.	1300	500	35
Durchschnitt der 5 Tiere		1904	—	2130	—	1680	450	32

Der Milchertrag von Gruppe B war im Durchschnitt dieser 14 Tage m 1,08 kg oder 11,34 Proz. höher als der von Gruppe A.

Vergleich der einzelnen Versuchsabschnitte untereinander nach Gruppe A und Gruppe B getrennt.

Betrachtet man an Hand der in den nachstehenden Tabellen XIa nd XIb aufgezeichneten Zusammenstellung der Milcherträge der eiden Gruppen in den einzelnen Versuchsabschnitten zunächst jede ruppe für sich, so ergibt sich folgendes.

Der durchschnittliche Milchertrag der Gruppe A ging in der *Übergangszeit zur ersten Periode* gegenüber der Vorfütterung etwas zurück und erreichte in *der ersten Periode* wieder die gleiche Höhe wie in der Vorfütterung. Der Rückgang in der *Übergangszeit zur zweiten Periode* ist im Vergleich mit der ersten Periode etwas größer als der der Übergangszeit zur ersten Periode, nämlich 0,30 kg oder 4,10 Proz. und bleibt auch bei der *zweiten Periode* bestehen. In der *Übergangszeit zur dritten Periode* ist — verglichen mit der zweiten Periode — eine Zunahme um 0,36 kg oder 4,68 Proz. zu verzeichnen. Die größte Steigerung des Milchertrags dieser Gruppe wird in *der dritten Periode* erreicht: 0,75 kg oder 8,88 Proz. gegenüber der Übergangszeit zu dieser, verglichen mit der zweiten Periode 1,11 kg oder 13,15 Proz. Gegenüber der ersten Periode ist eine Erhöhung um 0,84 kg oder 9,95 Proz. festzustellen.

Tabelle XIa. Gruppe A.

Versuchsabschnitt	Täglicher Durchschnitt	Steigerung (+) oder Verminderung (—) gegenüber											
		Vorperiode		Übergangszeit zur I. Periode		I. Periode		Übergangszeit zur II. Periode		II. Periode		Übergangszeit zur III. Periode	
	kg	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.
Vorperiode	7,61	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Übergangszeit z. I. Periode	7,48	— 0,13	— 1,73	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I. Periode	7,60	— 0,01	— 0,13	+ 0,12	+ 1,57	—	—	—	—	—	—	—	—
Übergangszeit z. II. Periode	7,30	— 0,31	— 4,24	— 0,18	— 2,47	— 0,30	— 4,10	—	—	—	—	—	—
II. Periode	7,33	— 0,28	— 3,81	— 0,15	— 2,04	— 0,27	— 3,68	+ 0,03	+ 0,40	—	—	—	—
Übergangszeit z. III. Period.	7,69	+ 0,08	+ 1,04	+ 0,21	+ 2,73	+ 0,09	+ 1,17	+ 0,39	+ 5,07	+ 0,36	+ 4,68	—	—
III Periode	8,44	+ 0,83	+ 9,83	+ 0,96	+ 11,37	+ 0,84	+ 9,95	+ 1,14	+ 13,50	+ 1,11	+ 13,15	+ 0,75	+ 8,58

Tabelle XIb. Gruppe B.

Versuchsabschnitt	Täglicher Durchschnitt	Steigerung (+) oder Verminderung (—) gegenüber											
		Vorperiode		Übergangszeit zur I. Periode		I. Periode		Übergangszeit zur II. Periode		II. Periode		Übergangszeit zur III. Periode	
	kg	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.	kg	Proz.
Vorperiode	7,78	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Übergangszeit z. I. Periode	8,12	+ 0,34	+ 4,18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I. Periode	7,71	— 0,07	— 0,90	— 0,41	— 5,31	—	—	—	—	—	—	—	—
Übergangszeit z. II. Period.	7,81	+ 0,03	+ 0,38	— 0,31	— 3,97	+ 0,10	+ 1,28	—	—	—	—	—	—
II. Periode	7,75	— 0,03	— 0,40	— 0,37	— 4,90	+ 0,04	+ 0,52	— 0,06	— 0,80	—	—	—	—
Übergangszeit z. III. Period.	8,60	+ 0,82	+ 9,53	+ 0,48	+ 5,58	+ 0,89	+ 10,34	+ 0,79	+ 9,70	+ 0,85	+ 9,88	—	—
III. Periode	9,52	+ 1,74	+ 18,27	+ 1,40	+ 11,97	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	—	—

Der durchschnittliche Milchertrag der Gruppe B erfuhr in der Übergangszeit *zur ersten Periode* bei einer Jodgabe von 60 mg eine Steigerung um 0,34 kg oder 4,18 Proz. gegenüber der Vorfütterung. In der *eigentlichen ersten Periode* selbst (60 mg Jod) senkte sich der Ertrag, verglichen mit der Übergangszeit zu dieser Periode, um 0,41 kg oder 5,31 Proz. Beim Vergleich mit der Vorfütterung ist der festzustellende Unterschied sehr gering, nämlich 0,07 kg oder 0,90 Proz.

In der zweiten Periode und deren Übergangszeit war die Jodgabe verdoppelt worden (120 mg Jod pro Tier und Tag). Der Vergleich des durchschnittlichen Milchertrags der *Übergangszeit zur zweiten Periode* mit dem der ersten Periode weist eine geringe Steigerung um 0,10 kg oder 1,28 Proz. auf. Gegenüber der Übergangszeit zur ersten Periode ist ein Rückgang um 0,31 kg oder 3,97 Proz. zu verzeichnen. Sehr gering ist die Erhöhung des Milchertrags dieses Versuchsabschnitts beim Vergleich mit der Vorfütterung: 0,03 kg oder 0,38 Proz.. In der *eigentlichen zweiten Periode* ging der Milchertrag wieder etwas zurück. Die Abnahme beträgt, verglichen mit der Übergangszeit zur zweiten Periode, 0,06 kg oder 0,80 Proz., mit der Übergangszeit zur ersten Periode 0,37 kg oder 4,90 Proz., verglichen mit der Vorfütterung: 0,03 kg oder 0,40 Proz. Gegenüber der ersten Periode ist eine geringe Erhöhung um 0,04 kg oder 0,52 Proz. festzustellen.

In der dritten Periode, sowie deren Übergangszeit wurde die Jodgabe auf 180 mg pro Tier und Tag erhöht. Die Steigerung der Milchmenge der *Übergangszeit dieser Periode* ist sehr beträchtlich, sie beläuft sich beim Vergleich mit der zweiten Periode auf 0,85 kg oder 9,88 Proz., bei einem solchen mit der Übergangszeit auf 0,79 kg oder 9,18 Proz. Die Gegenüberstellung des Ertrags mit dem der ersten Periode zeigt eine durchschnittliche Zunahme um 0,89 kg oder 10,34 Proz., die mit der Übergangszeit zu dieser Periode eine solche von 0,48 kg oder 5,58 Proz. Die Steigerung im Vergleich mit der Vorfütterung beträgt 0,82 kg oder 9,53 Proz. Die Zunahme, die der Milchertrag der Übergangszeit zur dritten Periode im Vergleich mit den übrigen Versuchsabschnitten erfuhr, ist bei der *eigentlichen dritten Periode* noch größer. Vergleicht man den Milchertrag dieser Periode mit dem ihrer Übergangszeit, so beträgt die Zunahme im Durchschnitt 0,92 kg oder 9,66 Proz., setzt man ihn dem der zweiten Periode gegenüber, ergibt sich ein Mehr von 1,77 kg oder 18,59 Proz. Gegenüber der Übergangszeit zur zweiten Periode ist eine Erhöhung um durchschnittlich 1,71 kg oder 17,96 Proz. vorhanden. Noch weiter bleibt der Milchertrag der ersten Periode hinter dem der dritten Periode zurück, der Unterschied zugunsten der letzteren beträgt 1,81 kg oder 19,01 Proz. Etwas geringer ist die Zunahme, die sich beim Vergleich mit der Übergangszeit zur ersten Periode errechnet: 1,40 kg oder 11,97 Proz. Die Gegenüber-

stellung mit der Vorfütterung läßt eine Steigerung um 1,74 kg od
18,27 Proz. erkennen.

3. Vergleich jedes einzelnen Versuchsabschnittes der ein
Gruppe mit dem dazugehörigen der anderen Gruppe.

Der Vergleich der beiden Gruppen miteinander liefert bei d
einzelnen Versuchsperioden nachstehende Ergebnisse:

Fütterung	Gruppe	Ertrag	Rein zahlenmäßiger Mehrertrag der Gruppe B gegenüber Gruppe A		Mehrertrag de Gruppe B unte Berechnung de Mehrertrages in der Vorfütteru	
		kg	kg	Proz.	kg	Pro
Vorperiode	A	7,61				
	B	7,78	+ 0,17	+ 2,18	—	—
Übergangszeit zur I. Periode	A	7,48				
	B	8,12	+ 0,64	+ 7,88	+ 0,47	+ 0,7
I. Periode	A	7,60				
	B	7,71	+ 0,11	+ 1,42	— 0,06	— 0,7
Übergangszeit zur II. Periode	A	7,30				
	B	7,81	+ 0,51	+ 6,53	+ 0,34	+ 4,3
II. Periode	A	7,33				
	B	7,75	+ 0,42	+ 5,41	+ 0,25	+ 3,2
Übergangszeit zur III. Periode	A	7,69				
	B	8,60	+ 0,91	+ 10,58	+ 0,74	+ 8,4
III. Periode	A	8,44				
	B	9,52	+ 1,08	+ 11,34	+ 0,91	+ 9,1

In der Vorfütterung ist der Milchertrag der Gruppe B um 0,17 k
oder 2,18 Proz. größer als bei Gruppe A. Bei der ersten Jodgabe vo
60 mg Jod beträgt der Unterschied des Ertrags von Gruppe B — de
Unterschied in der Vorfütterung ist dabei angerechnet — gegenüber A
+ 0,47 kg oder 5,70 Proz. In der ersten Periode mit gleicher Jodgab
geht der Milchertrag von Gruppe B zurück, der Unterschied gegenübe
der Gruppe A verschwindet praktisch. Zieht man in Betracht, da
Gruppe B in der Vorfütterung (beide Gruppen ohne Jod) schon eine
etwas höheren Milchertrag aufzuweisen hatte, so ergibt sich hinsichtlic
der Wirkung der Jodgabe von 60 mg, daß am Anfang des Versuchs
abschnitts eine Erhöhung des Ertrags stattfand, diese Erhöhung jedoc
nicht während des ganzen Verlaufs des Versuchsabschnitts konstan
blieb.

Im zweiten Versuchsabschnitt (Jodgabe 120 mg) beträgt di
Erhöhung des Milchertrags der Gruppe B gegenüber Gruppe A be
Berücksichtigung des Unterschieds der Vorfütterung in der Übergangs
zeit 0,34 kg oder 4,35 Proz., in der eigentlichen zweiten Periode 0,25 kg
oder 3,23 Proz. Die Steigerung des Milchertrags von Gruppe B in de

eigentlichen zweiten Periode tritt, wie aus der graphischen Darstellung der täglichen Milcherträge ersichtlich ist, erst am fünften Tage in deutlich erkennbarer Weise auf, um dann im übrigen Verlauf dieser Periode dauernd anzuhalten.

Die Steigerung der Milchmenge von Gruppe B gegenüber Gruppe A durch die Jodgabe von 180 mg ist sehr beträchtlich, sie beträgt in der Übergangszeit zur dritten Periode 0,74 kg oder 8,40 Proz. und in der eigentlichen dritten Periode selbst 0,91 kg oder 9,16 Proz., wobei der Unterschied beider Gruppen in der Vorfütterung schon berücksichtigt ist. Bei diesem Versuchsabschnitt war also die Jodwirkung nicht nur andauernd, sondern erhöhte sich in dessen Verlauf.

4. Die Wirkung der einzelnen Jodgaben auf den Milchertrag.

Bei der Auswertung des Versuchs kann auf eine Wirkung oder Nichtwirkung der Jodgaben durch zweierlei Schlüsse gefolgert werden. Entweder man behandelt Gruppe B gesondert für sich als *Periodenversuch* und erhält für die erste und zweite Periode einen nur geringen, innerhalb der Fehlergrenzen liegenden Milchzuwachs durch die Jodgaben von 60 und 120 mg, für die dritte Periode dagegen eine ganz einwandfreie Steigerung der Milchmenge von 0,820 kg (9,53 Proz.) bzw. von 1,740 kg (18,27 Proz.), oder man betrachtet beide Gruppen im gegenseitigen Vergleich der einzelnen gleichzeitigen Perioden und kommt zu demselben Ergebnis, daß nämlich — unter Berücksichtigung des von Anfang an vorhandenen Übergewichts der Gruppe B — die Ertragserhöhung der ersten und zweiten Periode nicht ganz als gesichert gelten kann, daß aber in der dritten Periode der Mehrgewinn der Gruppe B an Milch gegenüber Gruppe A mit 0,740 kg (8,40 Proz.) bzw. 0,910 kg (9,16 Proz.) wohl geringer ist bei der Behandlung des Versuchs als Periodenversuch, ein ziemlicher Zuwachs an Milch aber auch nach dieser Feststellung vorhanden ist.

Beide Schlüsse sind an Hand der Anordnung des gesamten Versuchs vollkommen berechtigt und stimmen gut überein. Um aber bei der an sich neuen Frage ganz sicher zu gehen, sei auf die zeitlich nicht auseinanderliegenden Gruppenunterschiede, welche ja auch niedriger sind als die Periodenunterschiede der Gruppe B, der größere Wert gelegt.

Es kann demnach die Wirkung der einzelnen Jodgaben auf den Milchertrag dahingehend zusammengefaßt werden, daß:

a) die Gaben von 60 und 120 mg Jod pro Tier und Tag keine sicheren Steigerungen des Milchertrags hervorrufen konnten. Die Steigerung der Milchmenge durch die Gabe von 60 mg Jod war von zu kurzer Dauer;

b) die Gabe von 180 mg Jod eine beträchtliche Steigerung de Milchmenge zur Folge hatte, die nicht nur anhielt, sondern innerhal des gleichen Versuchsabschnitts noch weiter zunahm.

III. Wirkung der jeweiligen Jodgabe auf den Fettgehalt der Milch.

Die Bestimmung des Fettgehalts der Ziegenmilch konnte au technischen Gründen erst ab 8. Mai, dem Beginn der Übergangszeit zu zweiten Periode erfolgen. Die Untersuchung (nach *Gerber*) wurde durc das milchwirtschaftliche Institut vom Morgen- und Abendgemel jedes einzelnen Tieres vorgenommen. Als Grundlage der Berechnunge diente der tägliche Durchschnittsfettgehalt jeden Tieres, berechnet au dem Fettgehalt von Morgen- und Abendgemelk. An Hand der unte angeführten Durchschnittsfettgehalte der Milch beider Gruppen is zu ersehen, daß der *prozentische* Fettgehalt der Milch von Gruppe A in den einzelnen Versuchsabschnitten ständig zunahm, während be der Gruppe B diese Steigerung nur bis zur Übergangszeit zur dritten Periode anhielt. In der dritten Periode ist ein Sinken des Fettgehalts der Milch von Gruppe B gegenüber den übrigen Versuchsabschnitten zu verzeichnen. Die Unterschiede in den *prozentischen* Fettgehalten der Milch von Gruppe A und B belaufen sich zuungunsten der Jodgruppe in der Übergangszeit zur zweiten Periode auf 0,16 Proz., in der zweiten Periode sowie in der Übergangszeit zur dritten Periode auf je 0,06 Proz., in der dritten Periode ist der Unterschied am größten, Gruppe B bleibt hier mit 0,28 Proz. gegenüber Gruppe A zurück.

Tabelle XII.

Versuchsabschnitt	Gruppe	Durchschnittsfettgehalt Proz.	Unterschied g	Durchschnittliche absolute Fettmenge g	Unterschied g
Übergangszeit z. II. Periode	A	2,59		188,07	
	B	2,43	— 0,16	189,78	+ 1,71
II. Periode	A	2,68		196,44	
	B	2,62	— 0,06	203,05	+ 6,61
Übergangszeit z. III. Periode	A	2,72		209,17	
	B	2,66	— 0,06	228,76	+ 19,59
III. Periode	A	2,81		256,64	
	B	2,53	— 0,28	240,85	— 15,79

Zieht man zum Vergleich der beiden Gruppen noch die durchschnittliche *absolute* Fettmenge heran, so zeigt sich, daß die absolute Fettmenge in der Übergangszeit zur zweiten Periode bei beiden Gruppen praktisch gleich ist, in der zweiten Periode ist die Fettausbeute bei Gruppe B um ein geringes größer. Das gleiche, jedoch in ungleich

tärkerem Maße ist in der Übergangszeit zur dritten Periode der Fall, ährend in der dritten Periode ein bedeutendes Sinken der absoluten 'ettmenge von Gruppe B zu verzeichnen ist.

Aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich das Urteil über die Virkung des Jods auf den Fettgehalt der Milch dahingehend zusammenassen, daß bei einer Gabe von 120 mg pro Kopf und Tag die in der Milch enthaltene *absolute* Fettmenge *höher* sein *kann*, der *prozentische* Fettgehalt aber, bedingt durch die Steigerung der Milchmenge, *niedriger* rscheint. Hinsichtlich der Wirkung der Jodgabe von 180 mg pro Kopf und Tag weisen die Ergebnisse dieses Versuchs nach einer anfänglichen *Erhöhung* eine *Verminderung* des *absoluten*, wie auch des *prozentischen* Fettgehalts auf.

IV. Der Einfluß der jeweiligen Jodgabe auf das Gewicht der Tiere.

Ergebnisse der Wägungen der Tiere:

Die Wägungen der Tiere erfolgten in Anlehnung an den Versuchsplan jeweils in Abständen von 10 bis 12 Tagen, vormittags 10 bis 11 Uhr, vor dem Füttern. Nach diesen Wägungen betrug das durchschnittliche Lebendgewicht einer Ziege:

Am 3. April 1925
bei Gruppe A . . . . . 33,90 kg, Beginn der Vorperiode.
„ „ B . . . . . 34,60 „

Am 14. April 1925
bei Gruppe A . . . . . 37,20 kg, Beginn der Übergangszeit zur ersten Periode.
„ „ B . . . . . 35,20 „ mit einer Jodgabe von 60 mg.

Am 23. April 1925
bei Gruppe A . . . . . 36,80 kg, Ende der Übergangszeit zur ersten Periode.
„ „ B . . . . . 35,40 „ mit einer Jodgabe von 60 mg.

Am 5. Mai 1925
bei Gruppe A . . . . . 38,40 kg, Erste Periode mit einer Jodgabe von 60 mg.
„ „ B . . . . . 36,50 „

Am 14. Mai 1925
bei Gruppe A . . . . . 39,50 kg, Übergangszeit zur zweiten Periode.
„ „ B . . . . . 36,90 „ mit einer Jodgabe von 120 mg.

Am 25. Mai 1925
bei Gruppe A . . . . . 36,70 kg, Zweite Periode mit einer Jodgabe von 120 mg.
„ „ B . . . . . 35,60 „

Am 3. Juni 1925
bei Gruppe A . . . . . 38,50 kg, Übergangszeit zur dritten Periode.
„ „ B . . . . . 36,20 „ mit einer Jodgabe von 180 mg

Am 12. Juni 1925
bei Gruppe A . . . . . 39,70 kg, Beginn der dritten Periode mit einer Jodgabe von 180 mg.
„ „ B . . . . . 37,80 „

Am 24. Juni 1925
bei Gruppe A . . . . . 40,20 kg, Ende der dritten Periode mit einer Jodgabe von 180 mg.
„ „ B . . . . . 38,80 „

Eine Beeinflussung des Gewichts der Tiere von Gruppe B durch die Jodgaben ist demnach nicht zu verzeichnen.

V. Einfluß der Jodgaben auf die Geschlechtstätigkeit.

Im Verlauf dieses Versuchs konnten keine Anzeichen des Auftretens der Brunst beobachtet werden. Erfahrungsgemäß werden Ziegen, die im Frühjahr lammten, erst im Frühherbst wieder brünstig.

C. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

1. *Die jeweiligen Jodgaben, welche als mit Absicht forcierte Dosen angesehen und auch als solche verstanden werden wollen, blieben ohne Einfluß auf das Verhalten und den Gesundheitszustand der Tiere.*

2. *Die Jodgaben von 60 und 120 mg pro Tier und Tag vermochten keine sicheren Steigerungen des Milchertrags hervorzurufen. Die Zunahme der Milchmenge durch die Gabe von 60 mg war zudem nur von kurzer Dauer.*

3. *Im Gegensatz hierzu verursachte die Jodgabe von 180 mg pro Tier und Tag eine beträchtliche Steigerung des Milchertrags.*

4. *Die Untersuchung des Fettgehalts der Milch zeigte, daß bei einer Jodgabe von 120 mg pro Tier und Tag die* absolute Fettmenge *höher war, der* prozentische *Fettgehalt, bedingt durch die Steigerung der Milchmenge, niedriger erschien.*

5. *Bei einer Gabe von 180 mg Jod pro Tier und Tag stieg anfangs die absolute Fettmenge und fiel dann wieder, während der prozentische Fettgehalt ständig niedriger war.*

6. *Irgendwelche Beeinflussung des* Gewichts *durch die Jodgaben hat nicht stattgefunden.*

7. *Eine Einwirkung des Jods auf die Geschlechtstätigkeit konnte nicht festgestellt werden.*

Anhang.

Gesamtmilcherträge je Gruppe und Tag in den einzelnen Versuchsabschnitten.

Vorfütterung.

	4. IV.	5. IV.	6. IV.	7. IV.	8. IV.	9. IV.	10. IV.	11. IV.	12 IV.	13. IV.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A . .	7,55	7,60	7,80	8,85	8,50	8,00	6,30	6,85	7,90	6,75	76,10	7,61
Gruppe B . .	7,90	7,90	7,40	8,50	8,90	7,95	7,20	7,00	7,70	7,40	77,85	7,78

Übergangszeit zur I. Periode.

	14. IV.	15. IV.	16. IV.	17. IV.	18. IV.	19. IV	20. IV.	21. IV.	22. IV.	23. IV.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A . .	6,55	6,55	6,85	7,35	8,15	8,15	7,80	7,55	8,00	7,80	74,75	7,48
Gruppe B . .	7,35	7,10	8,40	8,60	9,20	8,25	8,10	8,10	8,00	8,10	81,20	8,12

I. Periode.

	24. IV.	25. IV.	26. IV.	27. IV.	28. IV.	29. IV.	30. IV.	1. V.	2. V.	3. V.	4. V.	5. V.	6. V.	7. V.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A .	8,20	8,40	7,70	7,70	7,40	7,40	7,95	7,30	7,95	7,40	7,25	7,10	6,90	7,70	106,35	7,60
Gruppe B .	8,40	8,30	8,20	7,90	7,60	7,60	7,80	7,70	7,90	7,00	7,45	7,40	7,00	7,30	107,95	7,71

Übergangszeit zur II. Periode.

	8. V.	9. V.	10. V.	11. V.	12. V.	13. V.	14. V.	15. V.	16. V.	17. V.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A . .	7,70	8,05	7,60	5,75	6,70	7,20	7,20	7,60	7,30	7,90	73,06	7,30
Gruppe B . .	8,10	7,85	8,00	6,90	7,60	8,30	7,50	8,10	7,90	7,80	78,05	7,81

II. Periode.

	18. V.	19. V.	20. V.	21. V.	22. V.	23. V.	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.	29. V.	30. V.	31. V.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A .	6,85	7,35	6,80	7,70	7,00	7,10	7,00	6,80	7,55	7,30	7,60	7,70	7,90	8,10	102,65	7,33
Gruppe B .	7,30	7,35	7,30	7,50	7,05	7,80	7,25	7,35	8,30	8,05	7,90	8,05	8,60	8,70	108,50	7,75

Übergangszeit zur III. Periode.

	1. VI.	2. VI.	3. VI.	4. VI.	5. VI.	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.	10. VI.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A . .	7,60	7,60	7,40	7,70	7,35	7,30	8,10	7,25	8,30	8,25	76,85	7,69
Gruppe B . .	8,70	8,10	8,25	8,00	8,25	8,70	9,15	8,35	9,25	9,20	85,95	8,60

III. Periode.

	11. VI.	12. VI	13. VI.	14. VI.	15. VI.	16. VI.	17. VI.	18. VI.	19. VI.	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.	Summe	Durchschnitt
Gruppe A	8,40	7,75	7,20	8,30	7,95	8,60	8,60	8,30	8,55	9,00	9,20	8,65	9,00	8,70	118,20	8,44
Gruppe B	9,50	8,70	8,50	9,30	8,30	9,70	9,95	9,10	9,20	9,95	10,10	9,75	10,05	10,20	133,30	9,52

Zur Kenntnis des Jods als biogenes Element.

III. Mitteilung[1]):
Über den Chemismus des tierischen Jodstoffwechsels.

Von

H. Niklas, J. Schwaibold und K. Scharrer.

(Aus dem agrikulturchemischen Institut der Hochschule für Landwirtschaft und Brauerei Weihenstephan bei München.)

(Eingegangen am 30. Januar 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Im folgenden soll in Ergänzung der zweiten Mitteilung (Fütterungsversuch mit steigenden Jodgaben an Milchziegen)[2]) von Untersuchungen berichtet werden, welche über den Jodgehalt des Blutes und der Milch von Ziegen und dessen Schwankungen während eines größeren Zeitabschnittes bei gleichbleibender normaler Fütterung, sowie über die ändernden Einflüsse von peroral zugeführtem Jod anorganischer Bindung durchgeführt wurden.

Über Einzelheiten betreffs Charakterisierung der Tiere, Fütterung, Entwicklung, Gesundheitszustand, Menge und Qualität der erzeugten Milch wurde bereits an anderer Stelle berichtet[2]). Soweit Angaben dort in engem Zusammenhang stehen mit den Ergebnissen der hier geschilderten Untersuchungen, werden sie hier wieder erwähnt werden. Da die Versuchstiere und die Versuchsanordnung — vor allem auch die Höhe und zeitliche Einteilung der Jodgaben — identisch waren mit denen der oben erwähnten Mitteilung, erübrigte sich eine andere Zielsetzung und Fragestellung als die eingangs angeführte.

Von im ganzen zehn Versuchstieren wurden vier einer eingehenden Beobachtung unterworfen, wovon zwei, unter normaler Fütterung stehend, als Normaltiere anzusprechen sind, während die beiden anderen außer der Normalfütterung bestimmte Jodgaben erhielten. Die Auswahl wurde

[1]) Siehe auch I. Mitteilung: *B. Bleyer*, diese Zeitschr. **170**, 265, 1926; II. Mitteilung: *H. Niklas*, *A. Strobel* und *K. Scharrer*, Fütterungsversuch mit steigenden Jodgaben zu Milchziegen, ebendaselbst **170**, 277, 1926.

[2]) Siehe *H. Niklas*, *A. Strobel* und *K. Scharrer*, l. c.

unter Berücksichtigung guter und möglichst gleichmäßiger Lactationen getroffen. Auf Grund der analytischen Schwierigkeiten war eine Einbeziehung sämtlicher Versuchstiere in die Beobachtung nicht möglich. So wurde in diesem Falle eine vertikale Beobachtungsart gewählt, also die Beobachtung einiger Tiere möglichst häufig während eines längeren Zeitabschnittes. In einer demnächst erscheinenden Arbeit wurde daher als entsprechende Ergänzung eine horizontale Untersuchungsweise angewandt. (Beobachtung einer größeren Anzahl von Versuchstieren in gewissen Zeitabschnitten.)

1. Normaler Milch- und Blutjodspiegel.

Die Untersuchungen begannen am 28. Mai 1925, nachdem der Fütterungsversuch schon längere Zeit im Gange war[1]). Für die Normaltiere war dies nicht von Belang, und deren Beobachtung erstreckte sich auf etwa 3 Monate. Abb. 1 zeigt das Bild, das diese Untersuchungen

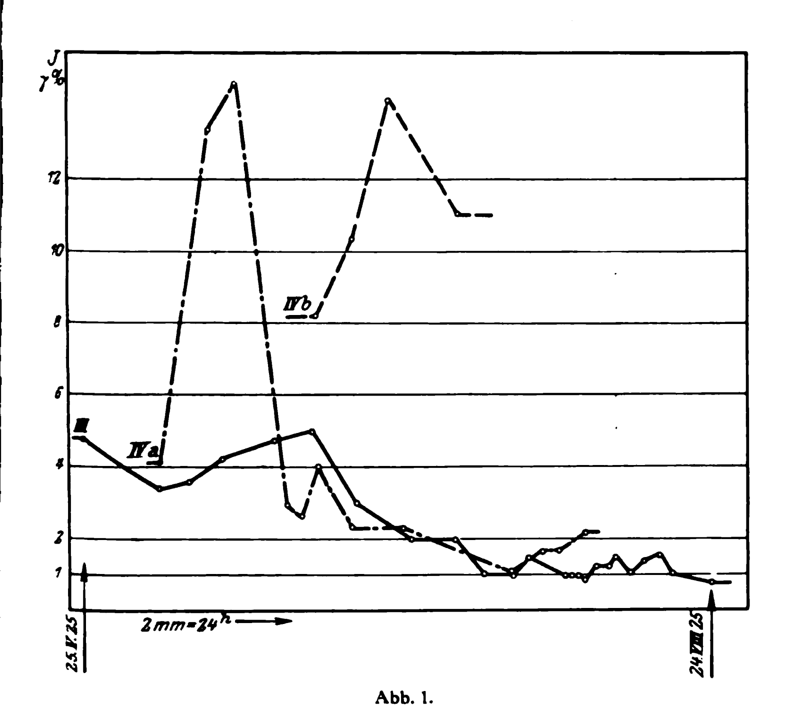


Abb. 1.

ergaben. Kurve III und IVa bringen den Milchjodspiegel der beiden Normaltiere, Kurve IV b gibt einen Anhaltspunkt für den Blutjodspiegel von Tier IVa festgestellt zum Vergleich mit demjenigen des Tieres II mit Jodfütterung in Abb. 2a und b[2]).

[1]) l. c.
[2]) Die Zahlenangaben finden sich in Tabelle I.

Tabelle I.

Datum 1925	Fett Proz.	Milchmenge ccm	Jodgehalt γ-Proz.
		Tier III.	
28. V.	2,50	1100	4,8
9. VI.	3,25	1100	3,4
13. VI.	3,40	1100	3,6
17. VI.	3,05	1200	4,2
24. VI.	3,15	1200	4,7
30. VI.	2,65	1400	5,0
6. VII.	3,15	1400	3,0
14. VII.	2,55	1200	2,0 (1,8)
20. VII.	3,10	1400	2,0
24. VII.	3,90	1300	1,0
28. VII.	3,05	1400	1,0 (1,0)
30. VII.	2,60	1500	1,5
4. VIII.	2,85	1300	1,0
5. VIII.	3,10	1300	1,0 (1,0)
6. VIII.	3,60	1400	1,0 (1,0)
7. VIII.	3,35	1400	1,0
8. VIII.	2,90	1600	1,2 (1,0)
10. VIII.	2,95	1350	1,2 (1,1)
11. VIII.	2,35	1300	1,5 (1,6)
13. VIII.	2,90	1100	1,0
15. VIII.	3,20	1300	1,4
17. VIII.	3,35	1450	1,6 (1,5)
19. VIII.	4,00	1300	1,0
24. VIII.	4,00	1400	0,8
		Tier IV.	
8. VI.	2,80	2200	3,6
12. VI.	2,70	2500	13,4
16. VI.	3,15	2700	14,8
23. VI.	2,75	2500	2,9
25. VI.	2,80	2500	2,6
27. VI.	2,60	2000	3,9
2. VII.	2,45	2150	2,3
9. VII.	2,80	2000	2,3 (2,3
24. VII.	3,00	1800	1,0
28. VII.	3,05	2100	1,7
30. VII.	2,85	2100	1,7
4. VIII.	3,15	2050	2,1

Eingeklammerte Zahlen bedeuten Kontrollbestimmungen.

Tabelle II.

Datum 1925	Fett Proz.	Milchmenge ccm	Jodgehalt γ-Proz.
		Tier I.	
28. V.	2,25	1500	681
9. VI.	2,45	1950	943
17. VI.	2,40	2300	729
24. VI.	2,30	2100	1525
30. VI.	2,50	2050	1000
2. VII.	2,20	1900	788
6. VII.	2,25	1950	488
14. VII.	2,60	1200	897
20. VII.	2,40	1350	1240
24. VII.	2,50	1400	1167
30. VII.	2,10	1500	333
4. VIII.	2,30	1500	12
6. VIII.	2,70	1550	4,0
10. VIII.	2,45	1400	2,4
13. VIII.	2,85	1500	1,0
15. VIII.	2,05	1500	1,4
17. VIII.	2,40	1400	2,1
19. VIII.	2,15	1550	2,5
24. VIII.	2,40	1750	1,4
		Tier II.	
27. V.	2,50	900	330
8. VI.	2,90	1450	920
23. VI.	2,70	1650	746
25. VI.	2,50	1700	668
26. VI.	2,50	1700	643
27. VI.	2,55	1750	607
30. VI.	2,25	1300	46,7
2. VII.	2,50	1400	6,9
6. VII.	2,35	1350	6,0
9. VII.	2,05	1100	2,3
14. VII.	3,50	1300	7,7
24. VII.	2,85	1150	10,0
28. VII.	2,75	1150	1,3
30. VII.	2,60	1200	1,7
4. VIII.	2,65	1200	1,0

Die natürliche Jodierung der Milch dieser beiden Tiere ergibt eine weitgehend ähnlichen Verlauf in derselben Größenordnung. Die Über jodierung bei Tier IV vom 12. bis 16. Juni ist nicht ohne weiteres z erklären. Ein durch Fieber angezeigter intensiverer Stoffwechsel fan nicht statt. Es bleibt die Möglichkeit einer vorübergehenden physiolo gischen Produktionssteigerung der Schilddrüse oder — was sehr un wahrscheinlich ist — eines zufällig höheren Jodgehalts der Futteratio in diesen Tagen. Bemerkenswert ist das kontinuierliche Absinken de Milchjodspiegels gegen Ende des Versuchs, also gegen Herbst. E besteht hier möglicherweise eine Parallele mit dem neuerdings fest gestellten, im Winter verminderten Blutjodspiegel beim Menschen[1]). Wenn bis jetzt noch keine Norm für einen physiologischen Blut- ode Milchjodgehalt gegeben werden kann, so muß doch der Gehalt de Milch gegen Ende dieses Versuchs als sehr niedrig angesprochen werden.

Nach allenfalls möglichen quantitativen Zusammenhängen zwischen Milch-, Fett- und Jodproduktion zu suchen, war nicht das Ziel dieser Beobachtungen. Dafür wäre eine ununterbrochene tägliche Beobachtung kaum zu umgehen. Die diesbezüglichen Zahlen sind jedoch in Tabelle I gegeben. Irgendwelche gleichgerichtete oder umgekehrte Proportionalität zwischen Fettgehalt einerseits, Milchmenge und Jodierung andererseits läßt sich nicht feststellen. Jedoch erkennt man, daß im allgemeinen keine erheblichere Steigerung oder Minderung in der Milchabsonderung eintritt, ohne eine gleichgerichtete Erscheinung bezüglich des Jodgehalts zu zeigen.

2. Milch- und Blutjodspiegel bei Resorptionsversuchen.

Das Bild dieser Untersuchungen zeigen die Kurven in Abb. 2a und b. Die Beobachtungen setzten ein am 27. Mai 1925, bei einer täglichen peroralen Jodzufuhr (außer dem Jodgehalt des Futters) von 120 mg Jod (in Form von Tabletten als 140 mg NaJ, 12 mg $NaHCO_3$ und 33 mg NaCl mit Milchzucker und Maisstärke), nachdem die Tiere vom 14. April bis 7. Mai 1925 60 mg Jod und ab 8. Mai 120 mg täglich erhalten hatten. Die Kurvenbilder wurden wegen der enormen Unterschiede in der Größenordnung getrennt und das unter dem Einfluß der Jodgaben stehende Ergebnis in 100fach kleinerem Maßstab gezeichnet.

Es tritt hier eine Vervielfachung des natürlichen Jodgehalts zutage, verbunden mit bedeutenden Schwankungen sowohl beim Vergleich der Jodspiegel verschiedener Tiere, als auch innerhalb des Verlaufs der Kurve eines einzelnen Individuums. Bei Tier II wurde die außerordentliche Jodzufuhr, die ab 1. Juni 180 mg täglich betragen hatte, am 27. Juni unterbrochen. Dies hatte ein plötzliches Absinken der

[1]) Siehe unter anderen *Veil* und *Sturm*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 147, 166ff., 1925.

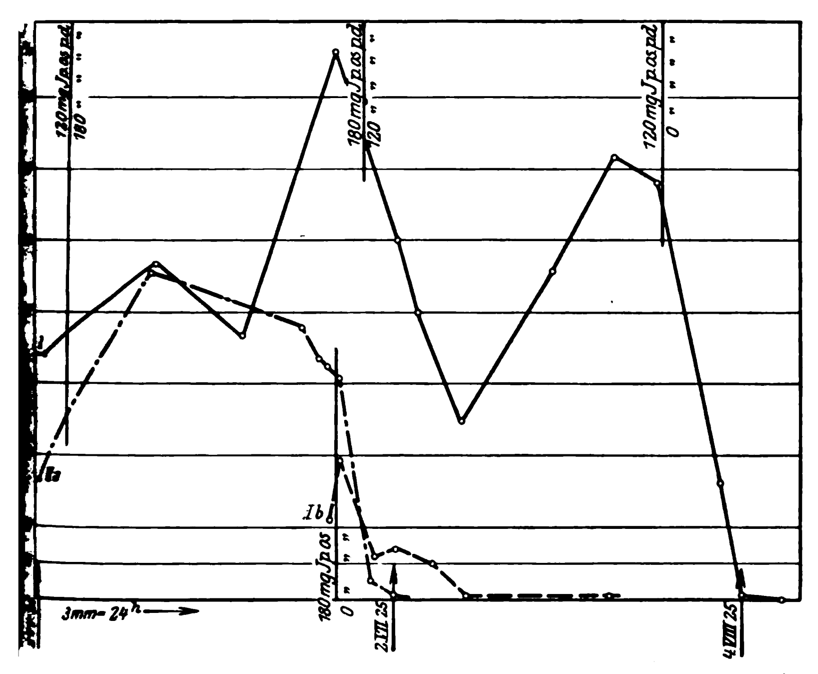

120 mg J p.os p.d.
180 " " " "
180 mg J p.os p.d.
120 " " " "
120 mg J p.os p.d.
0 " " " "
IIa
Ib
180 mg J p.os
0 " " "
3 mm = 24h
2.VII.25
4.VIII.25

Abb. 2a.

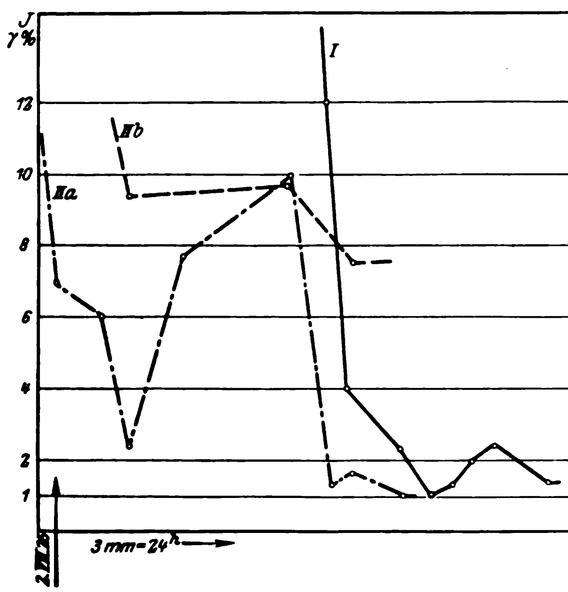

J
γ%
12
10
8
6
4
2
1
I
IIb
IIa
3 mm = 24h

Abb. 2b.

Jodkomponente der Milch zur Folge, so daß nach 12 Tagen der Milcl jodgehalt der Normaltiere annähernd erreicht war. Nach vorübe: gehender, gegenüber dem erreichten Stand erheblicher Steigerun war nach 4 Wochen der Jodgehalt der Milch in der Größenordnun identisch mit dem der Vergleichstiere. Das nämliche war bei Tier der Fall, jedoch mit dem Unterschied, daß es den „Normalstand" scho nach 16 Tagen wieder erreicht hatte. Dieses Tier hatte nach Beendigun der Jodgabe von 180 mg täglich am 28. Juni (begonnen am 1. Jun: bis zum 28. Juli eine tägliche Jodgabe von 120 mg erhalten.

Der Blutjodspiegel des Versuchstieres II in der Kurve Abb. 2b zeig nicht einen mit der zugehörigen Milch parallelen Verlauf, sofern de prozentische Jodgehalt verglichen wird. Ist einerseits die Jodierun bei außerordentlicher Jodzufuhr niedriger als die der Milch, so erfolg andererseits nach Beendigung der Jodgaben die Abnahme allmählicher

Ein paralleler Verlauf von Milchmenge und Jodgehalt kann i diesem Falle natürlich nicht erwartet werden. Es scheinen jedoch aucl hier stärkere Schwankungen in der Milchproduktion mit ebensolchei des Milchjodgehalts Hand in Hand zu gehen, womit jedoch nicht gleich zeitig gesagt ist, daß hohe Jodgaben starke Sekretion zur Folge hätten da offensichtlich die Menge des abgesonderten Jods auch bei gleich mäßiger Zufuhr in weiten Grenzen schwankt.

Die genauen Zahlen sind in Tabelle II wiedergegeben.

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen finden sich in Tabelle III

Tabelle III.

Jodgehalt γ-Proz. am:	26. VI. 1925	27. VI. 1925	30. VI. 1925	2. VII. 1925	6. VII. 1925	9. VII. 1925	24. VII. 1925	30. VII. 1925
Normaltier	—	8,2	—	11,4	—	14,2	—	—
Versuchstier. . . .	224	385	129	149	94	9,4	9,7	7,5

Am 26. VI. 1925 letzte Jodgabe 180 mg.

Tabelle IV bringt die Ergebnisse einer einmaligen Untersuchung der Milch der übrigen Versuchstiere.

Tabelle IV.

Datum 1925	Tier Nr.	Normaltiere, Milchjodgehalt γ-Proz.	Datum 1925	Tier Nr.	Versuchstiere, Milchjodgehalt γ-Proz.	Jodgaben
3. VI.	V	2,0	3. VI.	VIII	513	Seit 1. VI. 180 mg täglich
4. VI.	VI	1,9	4. VI.	IX	483	
5. VI.	VII	2,1	8. VI.	X	673	

3. Jodbindung in der Milch.

Es seien hier noch die Ergebnisse einiger in dieser Hinsicht orientierender Vorversuche angeführt. Es wurden Milchproben aus den Reihen des oben beschriebenen Versuchs untersucht. Bei zwei Milchproben (s. Tabelle I, Tier III, 24. Juli und Tabelle II, Tier I, 24. Juli) wurden die Eiweißbestandteile aus der Milch entfernt und für sich untersucht; ebenso das Serum mit Fett, Zucker und Mineralstoffen ohne weitere Trennung. Die Milchproben der Tabelle I, Tier IV, 4. August und Tabelle I, Tier III, 7. August, wurden in Fetteiweiß und Serum zerlegt und die beiden Bestandteile für sich zur Untersuchung gebracht.

Nach den Ergebnissen, die nachstehende Tabelle V bringt, liegt kein Grund vor, anzunehmen, daß das Jod anders als in anorganischer Verbindung vorlag[1]). Die nötigen Eingriffe wurden so schonend vorgenommen, daß eine Zersetzung nicht zu befürchten war.

Tabelle V.

[illegible]	Tier Nr.	Milchmenge ccm	Jod in Eiweiß γ-Proz.	Jod in Eiweiß-Fett	Jod in Reagenzien	Gesamtjod γ-Proz.
24. VII.	III	30	—	—	—	1,0
24. VII.	I	30	0,2	—	—	1167
4. VIII.	IV	40	—	Spuren*)	0,1	2,1
7. VIII.	III	50	—	Spuren*)	0,1	1,1

*) Weniger als 0,1 γ.

4. Einfluß von hohen, innerhalb eines kurzen Zeitabschnittes verabreichten Jodgaben auf den Jodgehalt von Blut und Stoffwechselprodukten.

Die eigentliche Grundlage des Versuchs, der den folgenden Angaben zugrunde lag, bildete die Beobachtung der Einwirkung von Jodgaben auf die Genitalfunktionen des weiblichen Schweines. Da die Versuche noch nicht abgeschlossen sind, die durchgeführten physiologisch-chemischen Untersuchungen jedoch eine Ergänzung für den übrigen Bericht bilden, werden sie hier noch beigefügt.

Das in dieser Weise beobachtete Tier war ein 1½jähriges Mutterschwein, dessen Haltung sich in keiner Weise von der normalen unterschied. Am 20. Mai 1925 und den beiden folgenden Tagen erhielt das Tier eine perorale Jodgabe (als Na J in Tablettenform) von je 450 mg. Dieser Versuchsanordnung liegen nun die folgenden Beobachtungen zugrunde. Tabelle V gibt die genauen Zahlen der Jodgehalte von Blut, Harn und Kot vor, während und nach der Behandlung, und die Kurven

[1]) Eine Beurteilung, ob Bindung an Aminosäuren vorlag, ließ die Art der hier angewandten Methoden nicht zu.

Abb. 3 a und b sollen dieselben veranschaulichen. Die letzten sin im Maßstab 1 : 10 mit Rücksicht auf die Verhältnisse vor und nac bzw. während der Behandlung gezeichnet.

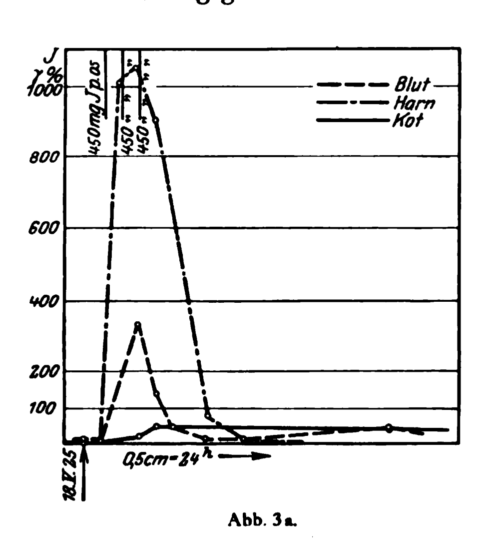


Abb. 3a.

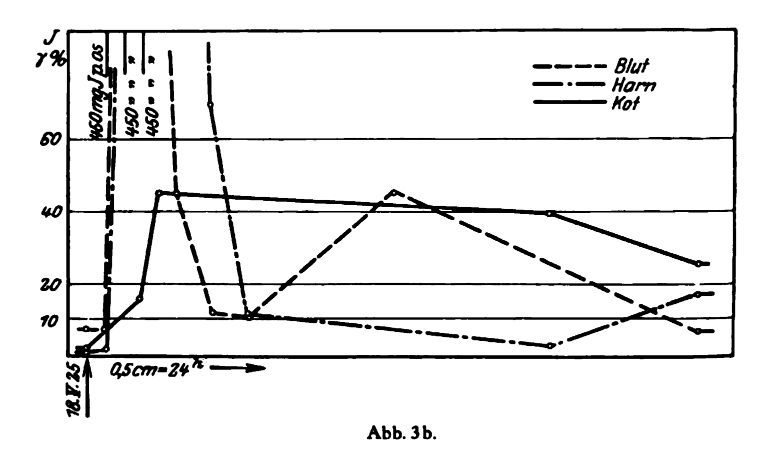


Abb. 3b.

Die Zahlen der Jodmengen im Kot zeigen, daß das peroral eingeführte Jod praktisch vollkommen resorbiert wurde.

Interessant wäre die Klärung der Frage nach der Ursache des auffallend langsamen Absinkens des Jodgehalts der Ausscheidungen von der gegenüber der ursprünglichen erheblich gesteigerten Höhe. Es kämen in Frage gesteigerte Jodzufuhr durch das Futter (jedoch unwahrscheinlich) oder vielleicht abgestoßene Darmepithelien, die

während ihrer Lebenstätigkeit die hohe Jodzufuhr benutzt hatten, solches zu absorbieren.

Ganz ähnlich wie es bei den Ziegen der Fall war, bewegt sich die Kurve des Blutjodspiegels: Eine plötzliche starke Überschwemmung des Blutes mit Jod, ein noch rascheres Absinken als dort — wohl infolge der kurzen Periode der Jodzufuhr — und eine nochmalige Erhebung, um dann sogar unter den ursprünglichen Wert zu sinken. Die bedeutendste Steigerung zeigt der Harn. Dazu kommt, daß die abgesonderte Menge in dieser Zeit sehr hoch war. Am 21. Mai 1925 (Tag der zweiten Jodgabe) wurden in 12 Stunden 10,7 kg abgesondert. Wenn auch Salzdiurese infolge geringer absoluter Salzmenge unwahrscheinlich erscheint, könnte eine spezifische Wirkung des Jods möglich sein.

Es geben diese Befunde ein ungefähres Bild der Geschwindigkeit, mit welcher dieses überschüssige Jod durch die Niere entfernt wird, derart, daß nach 5 Tagen nur mehr eine sehr mäßige Erhöhung über den Stand vor der Behandlung sich vorfindet[1]).

Tabelle V.

Datum	Jod peroral		Blut		Harn		Kot	
1925	Zeit	mg	Zeit	J γ-Proz.	Zeit	J γ-Proz.	Zeit	J γ-Proz.
18. V.			6a	7,5	10a	1,0	6p	1,8
19. V.			6p	7,5	6p	1,5	—	—
20. V.	9a 30	450	—	—	6p	1000	—	—
21. V.	9a 30	450	7a 20	327	6p	1050	6a 30	16,0
22. V.	9a 30	450	6a	141	9a 20	906	9a 20	45
23. V.			6a 20	44	—	—	—	—
25. V.			2p 30	11,7	2p	70	—	—
27. V.			6a 20	10,9	10a	11	—	—
4. VI.			nachm.	46,0	—	—	—	—
13. VI.			—	—	vorm.	2,5	vorm.	39
24. VI.			nachm.	6,5	vorm.	17	nachm.	25
4. VII.				3,7		1,9	—	—

[1]) Unter der in dieser Arbeit gebrauchten Bezeichnung für Jodmengen mit γ ist, wie allgemeiner üblich, 0,000001 g Jod zu verstehen. Über die Art der Methodik der Behandlung der Substanzen für die Mikrojodbestimmung und die Ausführung der letzteren, sowie über dabei gemachte Erfahrungen und vorgenommene Modifikationen ist eine besondere Mitteilung beabsichtigt.

5. Zusammenfassung.

Die Versuche lassen erkennen:

1. Peroral zugeführtes anorganisch gebundenes Jod wird un beschadet gleichzeitiger Fütterung vom Darm quantitativ resorbiert

2. Eine durch längere Zeit erfolgte außerordentliche Jodzufuh hat bei Ziege und Schwein nicht eine nachträglich anhaltende höher Jodierung der Körperflüssigkeit zur Folge.

3. Eine tägliche perorale Jodzufuhr von über 100 mg bei Ziege führt zu einer Jodierung der Körperflüssigkeiten, besonders der Milch von einer Höhe, die nicht mehr als physiologisch angesprochen werde kann, wenn auch sonst eine ungünstige Einwirkung auf den Gesundheits zustand der Tiere nicht festgestellt wurde.

Das Meerwasser als Durchströmungsflüssigkeit für das isolierte Froschherz.

Von

S. W. Ziganow.

(Aus dem pharmakologischen Laboratorium des medizinischen Instituts in Odessa.)

(Eingegangen am 18. Januar 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Sowohl für den experimentierenden Biologen als auch für den Kliniker ist die Frage nach einer Flüssigkeit, die unter gewissen Bedingungen das Blut zu ersetzen imstande wäre, von großem Interesse. Es kommt in der Tat vor, daß der Biologe an einzelnen isolierten Organen und Geweben experimentiert, die eventuell längere Zeit in überlebendem Zustande erhalten werden müssen. Der Kliniker hat mit Fällen zu tun, wo der Verlust an Blut durch irgend etwas ersetzt oder der Organismus mittels Durchspülen von diesem oder jenem toxischen Stoffe befreit sein muß. Die Versuche in dieser Richtung hatten zur Folge die Herstellung von verschiedenen künstlichen Medien, deren Zusammensetzung bis heute eine erhebliche Evolution erlitten hat.

Anfänglich, als zur Erhaltung der Lebenstätigkeit des Protoplasmas nur die Isotonie der Flüssigkeit als unumgänglich galt, wurde eine der Isotonie des gegebenen Tieres entsprechende NaCl-Lösung mit zugesetztem $NaHCO_3$ zur Neutralisierung der Stoffwechselprodukte mit dem Namen „physiologische" Lösung bezeichnet [*Gaule* (1).] Späterhin hat *S. Ringer* (2) dieser Lösung K und Ca zugegeben in Verhältnissen, in denen diese im Blute vorkommen. Weiterhin wurde durch eine ganze Reihe von Arbeiten verschiedener Autoren [*J. Loeb* (3), *Wo. Ostwald* (4), *W. Osterhout* (5), *Herbst* (6), *W. Bennecke* (7) u. a.] die Bedeutung einzelner Bestandteile der Ringer-

lösung eingehend aufgeklärt, wobei es sich erwies, daß ein Medium, d irgend ein einzelnes Kation enthält, für das lebendige Protoplasma v jeglicher Art in gewissen Grenzen giftig ist. Das Leben des Protoplasm ist nur bei gewissem, ganz bestimmtem gegenseitigen Verhältnis der ei zelnen Kationen möglich, wobei die einen als Antagonisten gegen die ander im Sinne eines Unschädlichmachens auftreten. Lösungen, die nicht n der Isotonie, sondern auch der Isoionie des Blutes entsprechen und v lebendigen Geweben und Zellen am besten vertragen werden, bezeichn man als „physiologisch äquilibrierte" [*J. Loeb* (8)].

Für die normale Lebenstätigkeit des Protoplasmas ist noch eine b stimmte Reaktion des Mediums notwendig, d. h. ein gewisses gegenseitig Verhältnis der H- und OH-Ionen in der Flüssigkeit.

Um das Zustandekommen einer entsprechenden Reaktion des Mediun herbeizuführen, werden diese oder jene sogenannten Puffersubstanzen de Salzlösungen zugesetzt.

Bei näherer Untersuchung der einzelnen Komponenten der Ringe lösung ergab sich, daß das Verhältnis zwischen einzelnen Kationen i derselben einem solchen im Blute gleich ist und dem gegenseitigen Verhältn dieser Kationen im Meerwasser, das auch noch Mg enthält, entsprich Das gegenüber einigen Organen (z. B. dem Darme) wahrscheinlich b weitem nicht indifferente Mg ist auch in dem künstlichen, von *Tyrode* vo geschlagenen Gemisch enthalten.

Salzgemische, die zum Erhalten der Lebenstätigkeit von Organe höherer Tiere künstlich hergestellt werden, sind folglich bloß mehr ode weniger annähernd dem Meerwasser gleich, das als das beste Milieu zun Konservieren genannter Organe anzusehen ist [*Höber* (9)].

Die direkte chemische Analyse bestätigt in der Tat die Identität de Mineralgehaltes des vitalen Mediums und des Meerwassers [*R. Qvinton* (10) „Die Organe der Wirbeltiere sind während des Lebens stets von einer Ar Meerwasser bespült" [*Höber* (9)].

Über die Ursachen dieser auffälligen Übereinstimmung machen sic mehr oder weniger wahrscheinliche Hypothesen geltend. So stellen di einen Autoren die Annahme auf, daß alle Lebewesen aus dem Meere ent standen sind [*Qvinton* (10)] und die Organismen den Salzkomplex des Meer wassers als eine Art von biogenetischem Überbleibsel behalten habe [*Loeb* (11)]. Andere Forscher neigen zu der Ansicht, daß im Gegenteil de Salzkomplex des Meerwassers selbst tierischen Ursprungs sei und aus Über bleibseln lebendiger Wesen, die jahrtausendelang in die Meere und Ozean geschwemmt wurden, entstehe [*P. Carton* (12)].

Es ist freilich nicht leicht zu entscheiden, ob diese Frage sich so ode anders verhält, allein schon der Umstand, daß die Salzzusammensetzun der Körpersäfte und des Meerwassers gleich sind, was durch zahlreich vergleichende, chemisch-analytische Befunde bestätigt wird, dürfte heut wohl kaum bezweifelt werden.

Das Einfachste wäre selbstverständlich, als Medium für überlebend Organe an Stelle von künstlichen, empirisch hergestellten Salzgemischen natürliches Meerwasser zu verwenden.

Dieser Gedanke drängt sich uns unwillkürlich auf. Bei Durchsicht der zu unserer Verfügung stehenden Literatur gelang es uns jedoch, nur eine Arbeit von *T. C. Burnett* (13) zu finden, wo die uns interessierende Frage

behandelt wird. *Burnett*, der am Herzen der Schildkröte experimentierte, hat festgestellt, daß dieses verdünnte, mit dem Blute isotonische Meerwasser anscheinend gut vom Herzen vertragen wird. Die Vorhöfe und Streifen des Ventrikels kontrahieren sich im Meerwasser ebensolange wie in der *Ringer*schen Lösung. Der durch NaCl hervorgerufene Stillstand des Herzens verschwindet bei Durchspülung mit Meerwasser.

Außerdem weist *Qvinton* (10) darauf hin, daß weiße Blutkörperchen (von Menschen, Fröschen und anderen) im Meerwasser 21 bis 25 Stunden am Leben bleiben, wobei sie ihre amöbenartigen Bewegungen nicht einbüßen.

Auf Anregung von Prof. *D. M. Lawrow* hin haben wir Versuche über die Anwendbarkeit des Meerwassers als Flüssigkeit (Medium) für das isolierte Froschherz unternommen.

Die lokalen Verhältnisse (Odessa — eine Seestadt) waren unseren Versuchen günstig.

Wasser nahmen wir im Odessaer Meerbusen, in der Entfernung von 1 km vom Lande und desgleichen in offener See.

Zu unseren Versuchen verwandten wir Esculenten, Männchen und Weibchen, Körpergewicht 40 bis 120 g, sowohl frische, eben eingefangene, als auch solche, die schon mehrere Wintermonate im Laboratoriumbassin zugebracht hatten.

Die Versuche wurden ein ganzes Jahr hindurch ausgeführt bei einer Temperatur von 10 bis 23° C. Mittels eines von uns [*S. Ziganow* (14)] konstruierten Apparates, der eine Modifikation von *K. Junkmanns* (15) Modell darstellt, waren wir imstande, die Zahl der Herzkontraktionen und das Volumen der vom Herzen ausgeworfenen Flüssigkeit zu ermitteln und eine Kurve der Herzkontraktionen am Kymographion aufzuzeichnen.

Der arterielle Druck war 11 bis 12 cm H_2O, der Venendruck 1 bis 2 cm H_2O, wobei beide sich im Anfang des Versuchs einstellten und dann schon keinerlei Veränderungen erlitten.

Jede 10 Minuten wurde die Menge der vom Herzen ausgeworfenen Flüssigkeit und die Zahl der Kontraktionen während derselben Zeitdauer gemessen. Aus der Größe des arteriellen Druckes (der Hubhöhe der ausgeworfenen Flüssigkeit) und der Menge der vom Herzen ausgeschleuderten Flüssigkeit wurde die Leistung des Herzens berechnet. Die Kurve der Herzkontraktionen wurde also jede 10 Minuten an der Trommel aufgezeichnet.

Alle Befunde wurden protokolliert und dann die Versuchskurve entworfen.

In der Regel wurde im Verlauf des Versuchs ein und dieselbe mit Sauerstoff gesättigte Flüssigkeit [nach *Junkmann* (15)] in der Menge von 50 ccm durch das Herz gelassen.

Ausnahmsweise wurden Versuche angestellt zur Aufklärung des Umstandes, wie Durchspülen mit beständig zu erneuernder Flüssigkeit das Herz beeinflußt.

Der Salzgehalt des Wassers im Odessaer Meerbusen entspricht dem gegenseitigen Verhältnis der für die Lebensfunktionen wichtigen Hauptkationen nach annähernd dem Ozeanwasser.

Zum Vergleich werden nachstehend Analysen von Schwarzmeerwasser und von solchem des Atlantischen Ozeans angeführt.

Analyse von Schwarzmeerwasser.
Nach *A. Lebedintzew* (16) (*Langeron* 1894).
Auf 1000 ccm Wasser.

NaCl	13,049
KCl	0,3521
$MgCl_2$	1,492
$MgBr_2$	0,034
$MgSO_4$	1,194
$CaSO_4$	0,434
$CaCO_3$	0,268

Analyse von Atlantisch-Ozean-Wasser.
Nach *Makin* (10) (1898).
Auf 1000 ccm Wasser.

NaCl	27,059
KCl	0,766
$MgCl_2$	3,666
$MgBr_2$	0,029
$MgSO_4$	2,296
$CaSO_4$	1,406
$CaCO_3$	0,033

Ein solches für die großen Weltmeere typisches [*R. Qvinton* (10), *van 't Hoff* (17)] Verhältnis von einzelnen Salzen ist der vorhandenen Literatur gemäß mehr oder weniger stationär und verändert sich wenig im Laufe der Zeit.

Demgegenüber ist die Gesamtsalzmenge (deren Konzentration) verschieden für die Ozeane und Binnenmeere einerseits, andererseits aber schwankt sie in ein und demselben Meere ebenfalls und ist abhängig von der herrschenden Jahreszeit und wohl auch von manchen anderen Umständen.

Das spezifische Gewicht des Wassers im Schwarzen Meere wechselt bekanntlich zu verschiedenen Jahreszeiten mit einer mittleren Schwingungsweite von 1,007 bis 1,013 [*Akimowitsch* (18)].

Nach unseren Beobachtungen ist das Wasser des Odessaer Busens konzentrierter zur Winter- und Herbstzeit (spezifisches Gewicht bis 1,014) und am wenigsten konzentriert im Anfang des Sommers, im Mai (spezifisches Gewicht bis 1,006). Daher mußten wir Meerwasser bis auf eine bestimmte Konzentration verdünnen, um es dem Froschblut isotonisch zu gestalten.

Es wurde durchaus praktisch befunden, zu diesem Zwecke die Herstellung einer gewissen Größe von spezifischem Gewicht (aräometrisch) anzuwenden.

Die Erfahrung hat nämlich gezeigt, daß für den Frosch eine Meerwasserlösung von 1,0065 spezifischem Gewicht als isotonisch anzusehen ist.

Die theoretische Berechnung nach *Karstens* (19), von *Torne* berichtigter Formel:

$$P = (S - 1) . 1319,$$

wo S = spezifisches Gewicht, auf 17,5° C bezogen, und P der gesamte Salzgehalt ist, ergibt die Gesamtsalzmenge in 1 Liter dieses Wassers 8,573 g.

Die von uns bestimmte Gesamtsalzmenge des Meerwassers vom spezifischen Gewicht 1,0065 war 8,6 pro Liter gleich, was mit dem nach der Formel

ermittelten Werte übereinstimmt. Der NaCl-Gehalt ist in diesem verdünnten Meerwasser gleich 6,6 pro Liter.

Einmal (Mai 1924) hatte die Meerwasserprobe genau 1,0065 spezifisches Gewicht und wurde bei den Versuchen nach vorhergehendem Durchseihen durch ein Wattefilter ohne jegliche Verdünnung per se verwendet.

In der Regel gebrauchten wir zur Verdünnung destilliertes, häufiger aber Leitungs-(Fluß-)Wasser, das für unsere Frösche ein normales Lebensmilieu ist.

Was die Reaktion des Meerwassers anlangt, so schwankt diese nach den genauen Messungen von *W. E. Ringer*, *Bethe*, *Sörensen*, *Palitsch* (20) in sehr engen Grenzen, und zwar von $p_H = 7,82$ bis 8,3. Speziell für das Tiefenwasser des Schwarzen Meeres gibt *Palitsch* $p_H = 7,26$.

Das p_H unseres verdünnten Meerwassers war gleich 7,95 bis 8,1[1]. Die Schwankungen des p_H des Meerwassers in so engen Grenzen sind unter anderem auf den Gehalt des Meerwassers an Puffern in Gestalt von kohlensauren Salzen zurückzuführen [*Höber* (20)].

Das p_H der *Ringer*schen Lösung, die nach *Höbers* Meinung für die Organe der höheren Tiere ein zu saures Medium abgibt, ist gleich 6,7 [*Michaelis* (21)]. Die Tyrodelösung hat $p_H = 7,7$ [*Höber* (20)].

Folglich war unser verdünntes Meerwasser seiner Reaktion nach mehr alkalisch als die Ringerlösung und hatte größere Ähnlichkeit mit der Tyrodelösung.

Nach *Dale* und *Thacker* (22) liegen die ertragbaren p_H-Grenzen für einzelne Teile des Froschherzens zwischen:

für Sinus	$p_H = 4$	bis 9,5
„ Vorhof	$p_H = 5,5$	„ 10,5
„ Ventrikel	$p_H = 6,5$	„ 11,0

Eine Erniedrigung der Wasserstoffexponenten von 7,7 bis zu 6,7 erniedrigt die Hubhöhe der Froschherzkontraktionen in beträchtlicher Weise [*A. J. Clarck* (22)].

Es ist also schon auf Grund dieser Daten a priori zu erwarten, daß verdünntes Meerwasser auch seiner Reaktion nach vom Froschherzen genügend ertragen werden kann.

Wir haben an dem isolierten Froschherz über 120 Versuche angestellt. Die Versuchsdauer war 5 bis 72 Stunden.

Das erste Ergebnis unserer Versuche war: Das Froschherz, durch das man isotonisch gestaltetes Meerwasser durchströmen läßt, kontrahiert sich normal, rhythmisch und behält längere Zeit seine Lebenstätigkeit. In der Regel bleibt das Herz 48 bis 72 Stunden arbeitsfähig, wobei die ungünstigen Bedingungen zur Nachtzeit, wo das Herz nicht beobachtet wird (also nicht mit Sauerstoff versorgt wird und etwas eintrocknet) in Betracht zu nehmen sind. Nach 48 bis 72 Stunden ist das Herz in Ruhestellung, antwortet aber noch lange mit einzelnen Schlägen auf mechanische Reize. Als Beispiel wollen wir hier einen kurzen Auszug aus einem Versuchsprotokoll (*Versuch 15*) und eine Kurve (*Abb. 1*) der normalen Herztätigkeit geben.

---

[1] Für die ausgeführten Messungen sagen wir dem Privatdozenten *D. L. Rubinstein* unseren innigsten Dank.

Versuch 15.

31. Dezember 1924. Rana esculenta. Gewicht 71,0 g.

Zeit		Temperatur in ^{0}C	Venendruck in cm H_2O	Arteriendruck in cm H_2O	Pulszahl in 1 Minute	Volumen der ausgeworfenen Flüssigk. in ccm	Arbeit pro 1 Minute	Arbeit pro 1 Kontraktion	Bemerkungen
31. XII.	12h40'	12,5	1,5	11,5	20	2,5	28,75	1,4	Das Herz kontrahiert sich normal, gut.
	2 10	12,5	1,5	11,5	16	1,7	19,55	1,22	Dasselbe.
	2 40	12,5	1,5	11,5	16	1,8	20,7	1,29	Dasselbe.
	3 10	12,5	1,5	11,5	15	1,7	19,55	1,30	Dasselbe.
	3 40	12,0	1,5	11,5	14	1,6	18,40	1,31	Dasselbe.
	4 10	12,0	1,5	11,5	15	1,6	18,40	1,23	Dasselbe.
	4 40	12,0	1,5	11,5	15	1,3	14,95	1,00	Dasselbe.
	5 10	12,0	1,5	11,5	14	1,3	14,95	1,07	Dasselbe. Veränderungen de[r] Herztätigkeit fehlen.
1. I.	10 10	9,0	1,5	11,5	10	1,1	12,65	1,26	Das Herz kontrahiert sich gut
	11 30	12,5	1,5	11,5	14	1,2	13,8	0,99	Dasselbe.
	12 30	13,5	1,5	11,5	17	1,2	13,8	0,81	Dasselbe.
	1 30	15,0	1,5	11,5	17	1,1	12,65	0,74	Dasselbe.
	2 30	15,0	1,5	10,5	18	1,3	14,65	0,81	Die diastolischen Erweiterungen sind etwas stärker.
	9 00	12,5	1,5	10,5	17	0,8	8,4	0,49	Dasselbe.
2. I.	10 30	9,0	1,5	8,5	11	0,7	5,95	0,54	Dasselbe. Das Herz kontrahiert sich gut.
	12 30	11,0	1,5	8,5	12	0,3	2,55	0,21	Dasselbe. Das Herz verliert die Flüssigkeit infolge eines Defektes in der Herzwand.
	12 40	11,0	Einstellung des Versuchs infolge Flüssigkeitsverlustes des Herzens.						

Aus *Junkmanns* (15) Arbeiten ist zu ersehen, daß bei Durchspülung des Herzens mit Ringerlösung nach 4 bis 8 Stunden regelmäßig ein Stillstand eintrat, was bei uns nie vorkam. Die Zusammenstellung von *Junkmanns* Versuchen mit unseren, die mit Anwendung einer analogen Methodik und bei gleicher Temperatur ausgeführt waren, berechtigt zu der Annahme, daß die um einigemal längere Dauer der Lebenstätigkeit des Herzens in unseren Versuchen ausschließlich von der Zusammensetzung der Durchströmungsflüssigkeit bedingt war.

Abb. 1. Normale Herztätigkeit bei Durchspülung mit Meerwasser.

Die Pulsfrequenz war von der Versuchsdauer wenig abhängig, wohingegen sie auf die Temperaturveränderungen der Umwelt oder der durchströmenden Flüssigkeit stark reagierte. Bei einer Temperatur von 9 bis 13^0 C war die Zahl der Herzschläge 12 bis 15, bei 15 bis 16^0 C 24 bis 30 und bei 20 bis 25^0 C 70 bis 80 in 1 Minute. Mit der Veränderung der Zimmertemperatur (Zentralheizung) erlitt auch die Zahl der Herzkontraktionen jedesmal eine entsprechende Veränderung.

Zuerst, wenn man begann, Meerwasser durch das Herz passieren zu lassen, verminderte sich gewöhnlich die Kontraktionszahl um vier bis acht Schläge im Vergleich zu der Zahl der Herzschläge im Organismus vor vollzogener Präparierung.

Nachher, wenn die Zimmertemperatur unverändert blieb, nahm die Kontraktionszahl allmählich ab, indem sie sich im Mittel um zwei bis drei Pulsschläge pro Minute in 6 bis 8 Stunden Arbeit verminderte. Die Temperatur beeinflußte außer dem Puls noch die Lebensdauer des Herzens.

Bei niederer Temperatur (10 bis 14° C) war die gesamte Lebensdauer bedeutend länger als bei höherer. Hier spielen offensichtlich einige Momente eine Rolle:

1. Bei erniedrigter Temperatur ist das Herz mehr tonisiert und die diastolische Herzerweiterung, die gewöhnlich gegen das Lebensende auftritt, setzt bedeutend später ein als bei höherer Temperatur, wenn das Herz weniger tonisiert ist.

2. Infolge verlangsamter Kontraktionen bei niederer Temperatur war die allgemeine Summe der innerhalb eines gewissen Zeitabschnittes geleisteten Arbeit des Herzens geringer, weshalb auch die Erschöpfung solcher, bloß mit anorganischen Stoffen gespeisten Herzen sich bedeutend langsamer einstellte.

3. Bei höherer Temperatur treten septische, das Herz dem Zugrundegehen nähernde Prozesse anscheinend schneller ein.

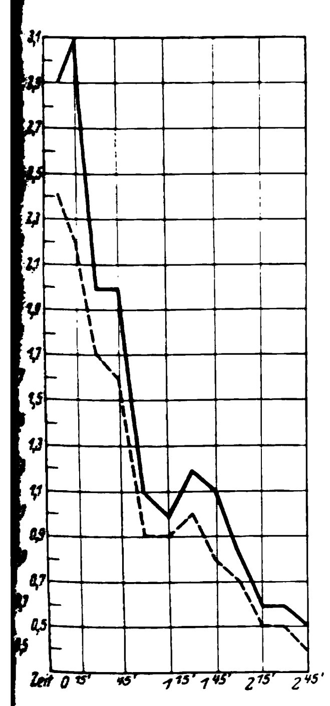


Abb. 2. Versuch 12.

Das Herz wird immer von neuer Flüssigkeit durchströmt.

—— Arbeit pro 1 Kontraktion (g·cm).

- - - Volumen der ausgeworfenen Flüssigkeit pro 1 Minute (ccm).

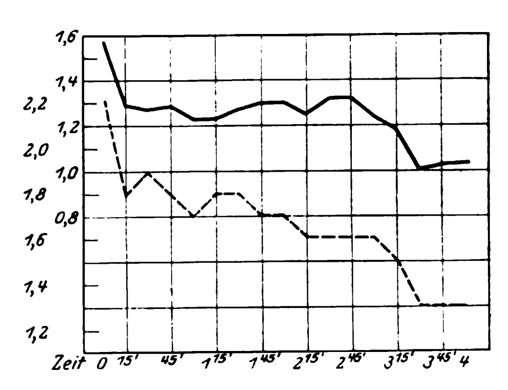


Abb. 3. Versuch 15.

Das Herz wird von ein und derselben Flüssigkeit durchströmt.

—— Arbeit pro 1 Kontraktion (g·cm).

- - - Volumen der ausgeworfenen Flüssigkeit pro 1 Minute (ccm).

Unsere Versuche haben gezeigt, daß es dem Herzen bei weitem nicht gleich ist, ob wir es die ganze Versuchsdauer hindurch mit fortwährend zu erneuernder oder mit ein und derselben Flüssigkeit durchspülen.

Im ersten Falle tritt die Abschwächung des Herzens sehr schnell ein, und im zweiten nimmt die Arbeitsfähigkeit nur allmählich und im Verlaufe von mehreren Stunden ab [vgl. *K. Junkmann* (15)].

Vermutlich wirken die Lebenstätigkeitsprodukte des Herzens auf dasselbe bis zu einer gewissen Grenze stimulierend. Die Tatsache, auf die noch *Langendorff* hinwies: „Das Lebensprodukt der Zelle ist ihr Erreger", wird auch bezüglich des isolierten Herzens bestätigt, indem sie eine besondere Bedeutung im Lichte der modernen Lehre von den Hormonen gewinnt. Die angeführten Kurven (Abb. 2 und 3) veranschaulichen das Gesagte.

Nach einer gewissen anfänglichen Abnahme der Arbeitsfähigkeit (vermutlich infolge des vor sich gehenden Anpassungsprozesses des Herzens an die neuen Lebensbedingungen), die etwa eine halbe Stunde dauert, tritt bei Durchströmen des Herzens mit ein und derselben Flüssigkeit eine Periode von mehr oder weniger gleichmäßiger Herztätigkeit ein, die 4 bis 6 Stunden anhält.

Diese stationäre Tätigkeitsperiode ist höchst geeignet für die Ausführung verschiedener pharmakologischer Untersuchungen.

Ferner vermindert sich die Leistungsfähigkeit des Herzens allmählich, die Diastolen werden größer, die Systolen kleiner.

Letzten Endes steht das Herz gewöhnlich in der Diastole nach vorhergehenden langdauernden diastolischen Pausen still (Abb. 4).

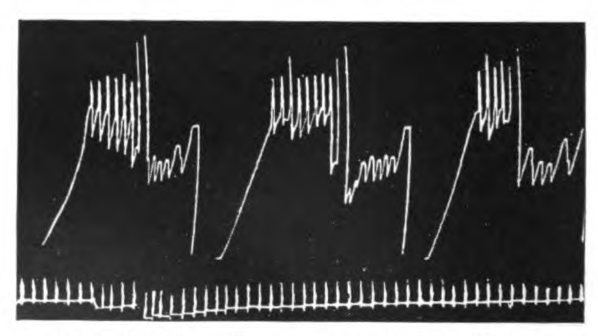


Abb. 4. Diastolische Herzpausen gegen Ende des Versuches.

Wird der Druck, unter dem die Flüssigkeit in das Herz strömt (Venendruck) bis zu einem gewissen Grade gesteigert, so hebt das Herz die Leistungsfähigkeit, seine vorrätigen Kräfte benutzend; die Herzkontraktionen erfahren auch eine leichte Beschleunigung [vgl. *Dreser, Frank, Weizsäcker* (23)].

Nachträglich erweist sich jedoch das Herz in solchen Fällen weniger lebensfähig.

Veränderungen des arteriellen Druckes nach der einen oder anderen Seite hin übten keinen großen Einfluß auf das Herz aus [vgl. *Frank, Weizsäcker* (23)]. Die Herzen der Weibchen sind schwächer tonisiert als die der Männchen, infolgedessen die Lebenstätigkeit der ersteren von kürzerer Dauer ist.

Die Menge der von dem Herzen auszuwerfenden Flüssigkeit ist, wie oben erwähnt, von dem venösen Druck abhängig, eine Drucksteigerung bewirkt eine Flüssigkeitszunahme. Ferner wird die Menge der ausgeworfenen Flüssigkeit noch von dem Mündungsdurchmesser der arteriellen Kanüle und desgleichen von der Individualität des Herzens beeinflußt. Bei einem Lumen der Kanüle von ½ mm betrug das in 1 Minute in der Mitte des Versuchs (stationäre Periode) ausgeworfene Flüssigkeitsquantum 2,3 ccm. Wurde aber das Kanülenlumen bis zu 1 bis 1½ mm größer genommen, was selbstverständlich nur bei großen Fröschen anwendbar war, so wuchs das Volumen der ausströmenden Flüssigkeit bis zu 5 ccm an.

Außer den Versuchen an normalen Herzen haben wir noch solche bei Vergiftung des Herzens mit verschiedenen dynamisch aktiven Stoffen angestellt. Angewandt wurden Adrenalin, Muscarin, Stoffe der Digitoxingruppe, KCN, Chloroform, Glucose und andere. Es wurden jedoch keinerlei qualitative Abweichungen von ihrer gewöhnlichen, bekannten Einwirkung bei Speisung des Herzens mit Meerwasser beobachtet.

Interessant ist die Tatsache, daß die Empfindlichkeit eines solchen Herzpräparats gegen Adrenalin (Firma Parke und Davis) bis zu einer Verdünnung des letzteren 1 : 1 Milliarde in der Durchströmungsflüssigkeit bestehen blieb (s. z. B. Versuch 44).

Versuch 44. 4. August 1925.

Zeit	Pulszahl	Volumen der ausgeworfenen Flüssigkeit 1 Min.	Arbeit pro 1 Min.	Arbeit pro 1 Kontraktion	Bemerkungen
12h25'	30	2,0	24,0	0,8	Das Herz kontrahiert sich gut.
12 26					+ Adrenalin (1 : 1 Milliard.)
12 30	49	2,1	25,2	0,51	Dasselbe.

Bei *K. Junkmann* (15) war nur die Adrenalinkonzentration 1 : 25 Millionen wirksam. Die höhere Empfindlichkeit des Herzens gegenüber Adrenalin in unseren Versuchen wurde wohl dadurch veranlaßt, daß Meerwasser mehr alkalischer ist als die Ringerlösung (s. oben). Die Alkalien steigern aber bekanntlich die Empfindlichkeit gegen Adrenalin (*W. Hülse* (24).

Folglich ist bis zur Isotonie verdünntes Meerwasser ein, in physiologischem Sinne, vollkommen äquilibriertes und vom Herzen der Kaltblüter ausgezeichnet zu ertragendes Medium [s. oben *T. Burnetts* (13) Versuche an Schildkröten], das der zu besagtem Zwecke gewöhnlich gebrauchten Ringerlösung nicht nachsteht, sondern dieselbe sogar übertrifft.

Die Anwendung von Meerwasser zu physiologischen und pharmakologischen Versuchen am Herzen von Kaltblütern, die durchaus möglich und wünschenswert ist, bestätigt nochmals *J. Loebs* und *Quintons* Ausführungen.

Weitere Beobachtungen müssen zeigen, ob Meerwasser auch f die Organe der Warmblüter ein ebenso geeignetes Medium ist. Die Frage ist nicht nur prinzipiell, sondern auch rein praktisch von B deutung.

Gegenwärtig macht sich nämlich in Frankreich eine ganze Schu mit *Qvinton* bemerkbar, die, Meerwasser als ein für die Warmblüter u den Menschen physiologisch äquilibriertes Medium ansehend, dasselbe subkutanen und intravenösen Einspritzungen auf einem weiten A wendungsgebiet in die Therapie eingeführt hat [*Qvinton* (25), *Lachere* (26) Außerhalb Frankreichs wird dieser Standpunkt bestimmt abgeleh und die Anwendung des Meerwassers in der Therapie als unzweckmäß anerkannt [*J. Loeb* (27)]. Die eine Ansicht beruht auf sehr lückenhaft Angaben von *Qvinton* selbst und auf klinischen Beobachtungen, die ande auf indirekten Nachweisen von *Burnett*, der nach erfolgter Einverleibun von Meerwasser bei Kaninchen Glykosurie feststellen konnte.

Exakte experimentelle Daten über Versuche an isolierten Organe der Warmblüter liegen bis heute noch nicht vor, wenigstens nicht in der u zugänglichen Literatur, und die Entscheidung dieser Frage bleibt wo der Zukunft vorbehalten.

Literatur.

1) *J. Gaule*, Arch. f. Anat. u. Phys. 1878, S. 291. — 2) *S. Ringer* Journ. of physiol. **3**, 1882; **4**, 1883; **7**, 1886. — 3) *J. Loeb*, Handb. d. Biochem d. Menschen u. d. Tiere **2**, H. 1, S. 104, 1910. — 4) *Wo. Ostwald*, Pflüger Arch. **106**, 568, 1905. — 5) *W. Osterhout*, Journ. of biol. Chem. **1**, 1905 Bot. Gaz. **42**, 1906. — 6) *C. Herbst*, Arch. f. Entwicklungsmech. **5**, 1897 **11**, 1900. — 7) *W. Bennecke*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **25**, 1907. — 8) *J. Loeb* Unters. über künstl. Parthenogenese 1906, S. 99. — 9) *R. Höber*, Physik Chem. d. Zelle u. d. Gewebe 1924, H. 2, S. 653. — 10) *R. Qvinton*, L'eau de mer milieu organique S. XII, S. 171, 219. Paris 1912. — 11) *J. Loeb* diese Zeitschr. **48** u. **58**. — 12) *P. Carton*, Origine vital et rôle alimentair du sel marin. Paris 1913. — 13) *F. C. Burnett*, Zitiert nach *J. Loeb* in Oppenheimers Handb. d. Biochem. d. Menschen u. d. Tiere **2**, H. 1, S. 139 u. 140, 1910. — 14) *S. Ziganow*, Ber. d. wissensch. Forschungsinstitute in Odessa 1925, S. 107. — 15) *M.* und *C. K. Junkmann*, Arch. f. exper. Path u. Pharm. **96**, 73, 78, 1923. — 16) *A. Lebedintzew*, Südruss. med. Zeitung 1896, Nr. 13/14. — 17) *Van 't Hoff*, Bildung der ozeanischen Salzablagerung. Heft 1. Braunschweig 1905. — 18) *H. Akimowitsch*, Daten über die Hydrologie des Odessaer Meerbusens. Odessa 1919. — 19) *A. Lebedintzew*, Über die Verhältnisse vom spezifischen Gewicht, Gesamtsalzmenge und Chlor im Meerwasser. Petrograd 1902. — 20) *R. Höber*, Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe 1922, H. 1, S. 153, 154. — 21) *L. Michaelis*, Wasserstoffionenkonzentration, S. 113. — 22) Zitiert nach *Höber*, Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe 1922, H. 1, S. 146—147. — 23) Zitiert nach *H. Handovsky*. Pflügers Arch. **198**, 57. — 24) *W. Hülse*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, 240. 1922. — 25) *R. Qvinton*, Soc. d. biol. 1897, S. 1063. — 26) *G. Lachère*. De l'eau de mer et du serum artific. chez le nouveau nez. Dissertation Paris 1905. — 27) *J. Loeb*, Oppenheimers Handb. d. Biochem. **2**, H. 1, S. 140, 1910.

Untersuchungen über den Calciumgehalt des menschlichen Serums.

Von

Di-Foutsin (Shanghai).

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 28. Januar 1926.)

Bekanntlich stellt der Ca-Gehalt des Serums für das Individuum eine ziemlich konstante Größe dar; so ergeben — wenn auch die von den einzelnen Forschern angegebenen Normalzahlen voneinander abweichen — Bestimmungen, die unter denselben Bedingungen und mit derselben Methodik am einzelnen Menschen ausgeführt werden, mit großer Genauigkeit immer den gleichen Wert.

Man weiß, daß der Ca-Spiegel im Serum nur wenig oder, vielleicht richtiger gesagt, nur sehr langsam auf Veränderungen in der Kalkzufuhr durch die Nahrung reagiert. So führen Steigerungen der Kalkeinnahme per os keineswegs immer zu einer Vermehrung der Kalkmenge im Serum, ja unter gewissen Umständen hat man sogar eine Verminderung des Kalkgehalts im Serum beobachtet. Offenbar wird endgültig das Kalkniveau von verschiedenen Faktoren beherrscht, von denen die Geschwindigkeit der Kalkmobilisierung, der Umfang der Kalkspeicherung und die Größe der Kalkausscheidung von Bedeutung sind.

Aus den Untersuchungen des letzten Jahrzehnts geht hervor, daß auf die an der Einstellung des Kalkgleichgewichts beteiligten Prozesse in erster Linie Schwankungen der Acidität, ferner Veränderungen in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Salze und endlich endokrine Wirkungen einen besonders starken Einfluß auszuüben vermögen.

So eindeutig nun die Veränderungen des Kalkspiegel sind, die man z. B. bei gewissen hormonalen Störungen beobachten konnte — es sei erinnert an die bekannte Kalkverminderung bei Ausfall der Nebenschilddrüsenfunktion, an das erhebliche Ansteigen des Kalkspiegels nach Injektion des neuerdings von *Collip*[1]) dargestellten wirksamen Prinzips der Epithelkörperchen, an die regelmäßige Verminderung bei Rachitis — so wenig ließen sich für eine große Anzahl von Krankheiten, die mit gewissen Veränderungen des Serumkalkwertes einhergehen, mit Sicherheit Gesetzmäßigkeiten in der einen oder anderen Richtung aufstellen.

Die Vorstellung, daß mancherlei Faktoren, die im einzelnen Falle nicht ohne weiteres übersehbar sind, auf diese Verhältnisse Einfluß haben, ist bei dem Bestreben für gewisse Krankheitsbilder ein charakteristisches Verhalten des Blutkalks aufzufinden, wohl zu wenig beachtet worden. So verdient z. B. der Einfluß des Alters, von dem *Leicher*[2]) und *Jansen*[3]) feststellen konnten, daß dem zunehmenden Alter regelmäßig eine Senkung der Blutkalkkurve parallel geht, oder der Einfluß der jeweiligen Konstitution, von der wir durch *Steehmann*[4]) wissen, daß gerade die asthenische durch einen besonders niedrigen Kalkspiegel gekennzeichnet ist, in jedem einzelnen Falle besondere Berücksichtigung bei der Beurteilung der Höhe des Serumkalkes. In diesem Zusammenhang scheint mir ferner eine Beobachtung nicht unwichtig zu sein, die ich unlängst bei wiederholten Kalkbestimmungen bei einem Patienten machen konnte: Beim Übergang von längere Zeit hindurch gepflegter Bettruhe zu körperlicher Bewegung sank der Serumkalkwert beträchtlich ab. Auf Anregung von Herrn Prof. *Morawitz* habe ich daraufhin das Verhalten des Kalkspiegels im Blutserum bei einer Reihe von ganz verschiedenen Krankheiten von diesem Gesichtspunkt aus untersucht.

Methodik.

Zur Ca-Bestimmung wurde das von *de Waard* angegebene Mikroverfahren benutzt. Die Blutentnahme erfolgte morgens vor der ersten Nahrungsaufnahme des Patienten. Das aus der Armvene entnommene, in kleinen Zentrifugengläschen aufgefangene Blut blieb bis zum Eintritt der vollständigen Gerinnung bei Zimmertemperatur stehen. Unmittelbar danach wurde scharf abzentrifugiert und es gelangten je 2 ccm des frisch gewonnenen klaren Serums für die einzelne Bestimmung zur Verwendung. In jedem Falle wurden Doppelbestimmungen ausgeführt.

Die Untersuchung wurde in der Weise geführt, daß bei einer Reihe von Patienten, welche seit längerer Zeit völlige Bettruhe beobachteten, der

---

[1]) *J. B. Collip*, Journ. of. biol. Chem. **63**, Nr. 2, S. 395, 1925.
[2]) *H. Leicher*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **145**, 85, 1923.
[3]) *Jansen*, ebendaselbst **125**, 168, 1918.
[4]) *Steehmann*, Jahrb. f. Kinderheilk. **94**, 21, 1921.

Ca-Gehalt des Blutserums ermittelt wurde. Soweit sich Gelegenheit dazu bot, wurde bei den untersuchten Fällen dann auch nach Unterbrechung der Bettruhe und Übergang zu körperlicher Bewegung die zweite Untersuchung angestellt. Die Ernährung wurde während des Zeitraums der verschiedenen Erhebungen nicht geändert.

Ergebnisse.

In einer Voruntersuchung wurde zunächst der Ca-Gehalt im Serum des gesunden Menschen ermittelt; hierbei wurde ein Durchschnittswert von 11,7 mg-Proz. gefunden. Diese Zahl liegt in der Nähe der von *Leicher* angegebenen, an einem größeren Durchschnitt erhobenen von 11,6.

In der beigefügten Tabelle wird das Resultat der Ca-Bestimmung in 14 Fällen verschiedener Krankheiten mitgeteilt. Die für die Beurteilung des Ca-Wertes wichtigen Angaben sind in den Stäben 3 bis 5 enthalten; in Stab 3 ist das Alter der Patientin, in Stab 4 die Diagnose und in Stab 5 die Zeit angegeben, seit welcher körperliche Ruhe eingehalten wurde; Stab 6 enthält den auf Grund gut übereinstimmender Doppelbestimmungen gefundenen Ca-Wert.

Tabelle.

	1	2	3	4	5	6
Nr	Datum 1925	Name	Alter	Diagnose	Bemerkungen	Ca mg-Proz.
1	21. V.	*K.*	24	Postencephalitis	nach 5 Tagen Bettruhe	14,4
2	21. V.	*D.*	18	"	7 Tage "	14,8
3	26. VI.	*B.*	23	Spondylitis	6 Mon. "	13,5
4	30. VI.	*K.*	25	Nephritis	nach 10 Tagen "	13,6
5	30. VI.	*W.*	25	Phtisis pulm.	mäßige Ruhe seit $1^1/_2$ J.	14,6
6	30. VI.	*B.*	29	" "	" " " 2 Mon.	13,1
7	30. VI.	*R.*	39	Nephrose	nach 1 Mon. Bettruhe	13,0
8	3. VII.	*Sch.*	42	Phtisis pulm.	" 3 " "	15,7
9	22. VI.	*F.*	51	Vitium	" $1^1/_2$ " "	13,8
10	6. VI.	*Kr.*	25	Nephritis	" 7 Tagen "	14,2
11	6. VI.	*W.*	49	Postencephalitis	" 3 Mon. "	15,0
12	6. VI.	*H.*	47	"	" 3 " "	14,4
13	6. VI.	*K.*	30	Phtisis pulm.	" 3 " "	16,7
14	30. VII.	*Sch.*	35	Thrombose	" 2 " "	13,2

Wie man sieht, ist in allen untersuchten Fällen der Ca-Gehalt sehr deutlich erhöht. Der aus der Tabelle berechnete Durchschnittswert beträgt 14,3 mg-Proz., was gegenüber dem Normalwert von 11,7 eine Erhöhung von etwa 22 Proz. bedeutet. Einzelne Fälle der Tabelle haben einen außerordentlich hohen Ca-Gehalt; z. B. Fall 8

15,7, Fall 11 15,0, Fall 13 16,7. Eine Beziehung zwischen der Daue der Bettruhe und der Höhe des Ca-Spiegels läßt sich nicht ableiten dafür müßte die Untersuchung wohl auf ein großes Material ausgedehn werden. Es ist bemerkenswert, daß auch schon nach kürzerer Bettruh ein hoher Ca-Wert beobachtet werden konnte. (Fall 1 nach 5 Tage 14,4, Fall 2 nach 7 Tagen 14,8, Fall 4 nach 10 Tagen 13,6, Fall 10 nac 7 Tagen 14,2).

Ist nun der Übergang von körperlicher Ruhe zur Bewegung mi einer Abnahme des Ca-Gehalts verbunden? Diese Frage konnte b dem begrenzten Material nicht entschieden werden; immerhin bot sic bei fünf der im Versuch befindlichen Patienten Gelegenheit, die Wirkun der Wiederaufnahme körperlicher Bewegungen zu beobachten. Ir ersten Falle sank der Ca-Wert nach fünftägigem Aufsein von 14, auf 12,0, im zweiten Falle nach achttägigem Aufsein von 16,6 auf 12,1 im dritten Falle nach viertägigem Aufsein von 13,2 auf 11,7. In de weiteren zwei Fällen, die nur vorübergehend aufstehen konnten, wurd der Ca-Gehalt unmittelbar vor dem Aufstehen und nach zweistündigen Aufsein ermittelt; nach so kurzer Zeit ließ sich keine Veränderun des Ca-Spiegel feststellen. Nach den mitgeteilten Befunden hat es de Anschein, als ob länger durchgeführte körperliche Ruhe — diese Moment ist den untersuchten Fällen gemeinsam — zu einer beträcht lichen Erhöhung des Ca-Spiegels im Serum führt. Unter den in de Tabelle aufgeführten befinden sich vier Fälle von Postencephalitis diese Krankheitszustände sind bekanntlich durch die Bewegungsarmu und Langsamkeit der einzelnen Muskelbewegungen ausgezeichnet Es ist gewiß auffallend, daß auch in drei weiteren Fällen dieser Art die sich außer Bett befanden, der Ca-Gehalt eine, wenn auch nich so hochgradige, so doch immerhin recht deutliche Erhöhung aufwies Sollte es sich in weiteren Untersuchungen bestätigen, daß Zustände von Parkinsonismus regelmäßig mit einer Steigerung des Ca-Werte einhergehen, so wäre diese Erscheinung in mehrfacher Beziehun interessant; einstweilen ist jedoch die Zahl der Untersuchungen zu gering, um mehr als eine Vermutung zu rechtfertigen.

Wie ist nun die Erscheinung des Anstiegs des Ca-Gehalts nach intensiver körperlicher Ruhe zu erklären? Hier kommen zwei Möglich keiten in Betracht: 1. Zustände von längere Zeit hindurch gepflegter körperlicher Ruhe gehen natürlich mit einer gewissen Atrophie d. h. Einschmelzung des kalkreichen Knochengewebes einher. Die Erhöhung wäre dann als eine Folge der gesteigerten Mobilisation anzusehen. 2. Die Muskeltätigkeit ist, wie aus verschiedenen experimentellen Arbeiten hervorgeht, mit einer vermehrten Aufnahme von Ca-Ionen durch das Muskelgewebe verbunden; es wäre denkbar, daß bei völliger Muskelruhe infolge verminderter Aufnahme von zur Ver-

igung stehendem Ca ebenfalls ein Anstieg im Blute bewirkt würde. Welches der beiden Momente für die beobachtete Erscheinung überhaupt bzw. mehr oder weniger von Bedeutung ist, läßt sich nicht von vornherein sagen.

Zusammenfassung.

Zustände von längere Zeit durchgeführter körperlicher Ruhe (Bettruhe) scheinen regelmäßig zu einer Erhöhung des Ca-Gehalts im Serum zu führen.

Bei Bestimmungen des Ca-Gehalts im Serum muß dieser Faktor berücksichtigt werden.

Über das spezifische Gewicht des Protoplasmas. I.

Von

Hans Leontjew.

(Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheite *Elias Metschnikow* in Moskau.)

(Eingegangen am 28. Januar 1926.)

Eines der interessantesten und schwierigsten Probleme de Biophysik stellt die *physikalische* Struktur des *Protoplasmas* dar.

Bei diesem Gegenstand unterliegt einzig und allein die Tatsach keinem Zweifel, daß sich das Protoplasma als „Flüssigkeit" verhält (1) Dies läßt sich an einer Reihe von Beispielen leicht nachweisen (2) (3) (4) Dennoch ist es nicht möglich, das Protoplasma als „homogene" Flüssig keit, wie es das Wasser oder eine Lösung von Natriumchlorid ist, zu betrachten. Das Protoplasma ist „heterogen" (5) (6) und ist disper soidologisch als *hydratisierendes* Emulsoid zu interpretieren. Zu dei physikochemischen Grundeigenschaften der flüssigen Körper gehör bekanntlich ihre Dichte. Untersuchungen, die speziell die Dichte de Protoplasmas behandelt hätten, fehlen aber fast gänzlich.

In allen biologischen und physiologischen Abhandlungen — soga in denjenigen, die in neuester Zeit (7) abgefaßt worden sind — wir darauf hingewiesen, daß das spezifische Gewicht des Protoplasma gleich 1,25 ist. Diese Zahl wurde vom Physiologen *Jensen* (8) im Jahr 1893 für das Plasma eines holotrischen Infusoriums angegeben.

Eine Reihe von Autoren (9) (10) (11) (12) hält die Angaben *Jensen* für irrtümlich, da seine Experimente bei einer Nachprüfung das gewünscht Resultat nicht ergaben (10) (12).

Außerdem ist die Zahl 1,25 *theoretisch* zu hoch. Es ist anzunehmen daß das spezifische Gewicht des Protoplasmas bei seiner Viskosität, di 23mal so stark ist als die Viskosität des Wassers (13) (14) (15), nur um ei geringes 1 übersteigt.

Die analytischen Ergebnisse stimmen mit dieser Voraussetzung gu überein. Der Wassergehalt im Körper einiger Myxamöben schwank nach den Angaben *Lepeschkins* (16) zwischen 79,3 und 86 Proz. und erreich manchmal 94 Proz.

Die Angaben *Jensens* wurden auch durch spätere, namentlich von einigen amerikanischen Forschern unternommene Versuche, die Dichte des *gleichen* Infusoriums festzustellen, widerlegt.

So gibt *Platt* (17) die etwas zu niedrigen Zahlenwerte 1,018 an, während *Lyon* (9) den mittleren Wert 1,048 bis 1,049, der theoretisch der annehmbarste ist, gefunden hat.

Mit diesen Zahlen stehen die Werte von *Kanda* (19) 1,038 bis 1,039 in gutem Einklang.

Mit Hilfe eines vollkommneren Verfahrens — *pyknometrisch* — bestimmte *Bresslau* (10) das spezifische Gewicht des Protoplasmas. Er arbeitete mit *Süßwasserturbellarien* und erhielt Werte von 1,020 bis 1,055. Allein auch die Untersuchungen von *Bresslau* sind nicht als völlig einwandfrei anzusehen.

Zur Lösung der Frage nach der Dichte des „lebenden" Protoplasmas kann ohne jeden Zweifel die Methode der „fallenden Kugeln" (19) verwertet werden, die den Physikern für die Bestimmung des Koeffizienten der inneren Reibung von zähen Flüssigkeiten dient.

Bekanntlich hat *Perrin* (20) diese Methode mit erheblichem Erfolge zur Bestimmung des Radius *mikroskopischer* Teilchen von Gummigutt angewendet. Vermittelst ebenderselben Methode gelang es auch vor kurzem, das spezifische Gewicht eines Mikroorganismus festzustellen (12).

Diese Methode beruht auf der Feststellung, daß in einer Flüssigkeit die Bewegung des unter dem Einfluß einer bestimmten Kraft stehenden Körpers von der inneren Reibung der Flüssigkeit abhängig ist. Das allgemeine Gesetz, nach dem die Bewegung erfolgt, wurde von *Stokes* (21) aufgestellt und lautet in seiner speziellen Form folgendermaßen:

$$V = \frac{2}{9} \cdot \frac{r^2(D-d)g}{\eta} \tag{1}$$

wo

V = die Geschwindigkeit in cm/sec,
g = die Schwerkraftbeschleunigung,
r = den Radius der Kugel,
D = die Dichte der Kugel,
η = die Viskosität der Flüssigkeit,
d = die Dichte der Flüssigkeit

bedeutet.

Wenn V gegeben ist, d. h. wenn diese Größe unmittelbar durch das Experiment festgestellt worden ist, so kann der D-Wert bestimmt werden, da die übrigen Größen (in Einheiten des CGS-Systems) bekannt sind.

Als Objekt wurde aus begreiflichen praktischen und theoretischen Gründen die *Amöbe* gewählt, da sie ohne weiteres als *kleines Protoplasmaklümpchen betrachtet werden kann.*

Die Beobachtung der Fallgeschwindigkeit der Amöbe wurde in eine Küvette von entsprechender Größe vorgenommen, die mittels Kanada balsam aus optischem Glas zusammengeklebt und mit Klemmen am Objekt tisch eines horizontalen, mit Messungsokular versehenen Mikroskops be befestigt war. Zwischen der Lichtquelle und dem Spiegel des Mikroskop befand sich ein Gefäß (10 cm breit) mit parallelen Wandflächen, das, un die Erwärmung der in der Küvette befindlichen Flüssigkeit zu verhindern mit einer Alaunlösung gefüllt war. Aus denselben Gründen wurden di Lampe und das Wärmefilter mit dickem Asbestkarton verhüllt und de Strom erst bei Beginn des Experiments eingeschaltet. Die Passagezei wurde durch ein Sekundometer registriert. In die Küvette gelangten di Amöben aus einer speziellen Pipette, die es ermöglichte, ein kleines „Nebel wölkchen" zu gewinnen. Dabei wurde die Fallzeit der einzelnen Exemplar in Betracht gezogen (12).

Die Amöbe (*Naegleria* sp.), die aus der Topferde von Zimmer pflanzen gewonnen worden war, wurde auf Agar nach *Froch* (22 kultiviert.

Am dritten und vierten Tage wurden auf dem Nährboden die Amöben, von den durch Strichkulturen *B. coli* gebildeten Sektoren, im Überfluß gefunden. Am vierten Tage wurden die Amöben mittels einer Öse (0,5 cm im Durchmesser) aus Platindraht (0,1 mm), der vorher in destilliertes Wasser getaucht worden war, damit sich an der Öse ein Tropfen bilde, vorsichtig von der Oberfläche des Agars abgehoben und in ein kleines Zentrifugenglas gebracht. In dieses war zuvor 1 ccm destillierten Wassers eingegossen worden, nach Einsammlung der Amöben wurden weitere 4 ccm hinzugetan. Das Einsammeln dauerte so lange, bis fünf bis acht Amöben im Gesichtsfeld sichtbar wurden (*Leitz* Objekt. 7, Okul. 2). Darauf wurden die Amöben mittels Handzentrifuge sedimentiert, das Wasser bis zu 0,5 ccm dekantiert und wieder bis zu 5 ccm hinzugegossen.

Die mechanischen Manipulationen der Übertragung und des Zentrifugierens riefen die „Verkugelung" der Amöben hervor, was einen günstigen Umstand zur Ausführung des Experiments ergab.

Als Suspensionsmittel wurde für die Amöben überall destilliertes Wasser (doppelte Destillation im Glasgefäß) angewendet, da dasselbe keinerlei wahrnehmbare schädliche Wirkung auf die Amöben ausübte.

Sogleich nach der Einsammlung bzw. vor dem Versuch wurde ein mikroskopisches *Kontroll*präparat bereitet, an dem nach Beendigung des Experiments die *typische* Entstehung der Pseudopodien und Bewegung beobachtet werden konnte.

Die Tatsache, daß destilliertes Wassers für die sogenannten Protozoen unschädlich ist, ist nicht neu. Die Infusorien leben darin *einige* Tage lang (23) (24) (25). Destilliertes Wasser mit der spezifischen Leitfähigkeit $2 \cdot 10^{-6}$ verhält sich ihnen gegenüber sogar als „physiologische" Lösung (26).

Die durchschnittliche Fallgeschwindigkeit von Amöben ($r = 8\,\mu$) beträgt 5,71 μ pro Sekunde bei $t^0 = 15{,}0$ bis $15{,}7^0$ C.

In der Gleichung (1) ergab sich also folgendes:

$$r^2 = 0{,}000\,000\,64 \text{ cm}$$
$$g = 981{,}5$$
$$d = 0{,}999 \ (27)$$
$$\eta = 0{,}011 \ (28)$$
$$V = 0{,}000\,571 \text{ cm/sec}$$

Daher

$$D = 1{,}043$$

Der erhaltene Index ist natürlich nicht von absolutem Wert. Eine Reihe von Faktoren kann Schwankungen verursachen, jedoch ergibt dieser Index, der *theoretisch* der annehmbarste ist, zweifellos einen der *mittleren* Zahlenwerte für das spezifische Gewicht des Protoplasmas *im allgemeinen*.

Die Arbeiten werden fortgesetzt.

Literatur.

1) *L. Rhumbler*, Das Protoplasma als physikalisches System, 1914; also *R. Chambers*, The physical structure of protoplasm in „General Cytology", edit. by V. Cowdry, 1924, S. 237 bis 309. — 2) *N. Gaidukov*, Dunkelfeldbeleuchtung und Ultramikroskopie, 1910. — 3) *A. Meyer*, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle **1**, 5 bis 10, 1920. — 4) *H. Erhardt*, Handb. d. Arbeitsmeth., herausgegeb. v. *Abderhalden*, V. Abt., 2, 157, 1922. — 5) *A. Tschermak*, Allgemeine Physiologie **1**, 66, 1916. — 6) *F. Moulin*, Nederlandsch. tijdschr. Geneeskunde **67**, 1734, 1923. — 7) *A. Tschermak*, l. c. **1**, 141, 1916. — 8) *P. Jensen*, Arch. f. d. ges. Physiol. **54**, 537, 1893. — 9) *E. Lyon*, Amer. Journ. of Physiol. **14**, 421, 1905. — 10) *E. Bresslau*, Verh. d. deutsch. zool. Ges. 1913, S. 226. — 11) *J. Schaefer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **195**, 227, 1922. — 12) *H. Leontjew*, ebendaselbst **209**, 705, 1925. — 13) *F. Weber*, Kolloid-Zeitschr. **20**, 169, 1917. — 14) *Wm. Seifriz*, Bot. Gaz. **70**, 360, 1920. — 15) *H. Freundlich* und *Wm. Seifriz*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **104**, 233, 1923. — 16) *W. Lepeschkin*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **41**, 179, 1923. — 17) *J. Platt*, Amer. Natur. **33**, 30, 1899. — 18) *S. Kanda*, Biol. Bull. **35**, Nr. 2, 1918. — 19) *K. Arndt*, Handb. d. phys.-chem. Techn. 1922, S. 563. — 20) *J. Perrin*, Ann. de chim. et de phys. **18**, 5, 1909. — 21) *G. Stokes*, Math. and physic.Papers **8**, 59. Cambridge 1901. — 22) *W. Nöller*, Die wichtigsten parasitischen Protozoen **1**, 95, 1922. — 23) *H. Jennings*, Journ. of Physiol. **21**, 264, 1897. — 24) *E. Towle* Amer. Journ. of Physiol. **12**, 220, 1905. — 25) *J. Daniel*, ebendaselbst **23**, 48, 1908. — 26) *W. Sawitsch*, Ber. d. Inst. f. exper. Biol. **1**, 36, 1921 (russisch). — 27) *Landolt-Börnstein*, Phys.-chem. Tabellen **1**, 74, 1923. — 28) *Dieselben*, ebendaselbst **1**, 135, 1923.

Chemische Veränderungen im Blut durch Narkose. Ruft die Äthernarkose eine Alkalose hervor?

(Zugleich ein Beitrag zur Anisoionie des Blutes.)

Von

Helgi Tómasson.

(Aus der Staats-Irrenanstalt bei Vordingborg, Dänemark.)

(Eingegangen am 30. Januar 1926.)

Die Forscher, welche sich in den letzten Jahren mit der Wirkung der Äthernarkose auf das Säure-Basengleichgewicht beschäftigt haben, scheinen darüber einig zu sein, daß die Äthernarkose im Tierversuch eine Acidose hervorruft.

Van Slyke, Austin und *Cullen* (1) sahen 1922 bei sechs Hunden „a true acidosis, with increase of hydrogen ion concentration and fall of the alkaline reserve". Gleichzeitig fanden *Stehle, Bourne* und *Barbour* (2) dasselbe; wenn sie vorher den Hunden Morphin injizierten, blieb die Alkalireserve durch die Narkose praktisch unbeeinflußt (Morphin allein hob die Alkalireserve empor), und auch die Abnahme der p_H war bedeutend kleiner, als wenn Äther allein gegeben wurde [was merkwürdig scheinen kann, denn Morphin allein sollte auch eine Abnahme der p_H hervorrufen (3)]. Auch die Na—K-Ausscheidung durch die Nieren wurde untersucht und *während* der einfachen Äthernarkose stark herabgesetzt, in der Nachperiode dagegen stark gesteigert befunden; bei der Morphin-Äthernarkose wuchs die Na—K-Ausscheidung sowohl während der Narkose als in der Nachperiode. Im Jahre 1924 haben *Ronzoni, Koechig* und *Eaton* (4) sowie *Austin, Cullen, Gram* und *Robinson* (5) die Acidose bei Äthernarkose von Hunden bestätigt.

Beim *Menschen* haben im Jahre 1917 *Caldwell* und *Cleveland* (6) herabgesetztes Plasmabicarbonat während der Äthernarkose gefunden.

Direkte p_H-Bestimmungen im Menschenblut während einer Narkose scheinen nicht früher veröffentlicht zu sein.

Im Laufe anderweitiger Untersuchungen habe ich Gelegenheit gehabt, p_H im Blute von zwei körperlich gesunden Menschen zu bestimmen; und weil ich ganz andere Verhältnisse finde als die Untersucher, die sich nur im Tierversuch mit der Frage beschäftigten, können meine Befunde vielleicht ein gewisses Interesse beanspruchen.

Zur p_H-Bestimmung habe ich die kolorimetrische Methode von *Cullen* (7) angewandt, in einer mir von Herrn Prof. *Henriques* (physiol. Institut Kopenhagen) freundlichst überlassenen Modifikation, wofür ich hier meinen besten Dank bringe. Man läßt das Blut hiernach durch eine weite Kanüle direkt in eine genau kalibrierte 2-ccm-Pipette hineinlaufen, indem die Verbindung zwischen der Kanüle und der Pipette durch ein kurzes Gummiröhrchen hergestellt wird. ½ ccm Blut wird von der Pipette sofort in zwei speziell konstruierte Zentrifugierröhrchen abpipettiert, die 9,5 ccm 0,9proz. — CO_2-freie — NaCl-Lösung von etwa 20° C und 0,4 ccm Phenolrotindikator unter Paraffin enthalten; in zwei andere Zentrifugiergläser mit 9,5 ccm 0,9proz. NaCl ohne Paraffin und ohne Indikator werden die zurückgebliebenen zwei ½ ccm abpipettiert. Sämtliche Zentrifugierröhrchen werden zum schnellstens etwa 3 Minuten lang in einer elektrischen Zentrifuge mit der Tourenzahl 5000 zentrifugiert und im Kolorimeter bei etwa 20° C abgelesen. Die Kolorimeterskala wird aus *Sörensens* Phosphatgemischen, die nicht mehr als etwa 3 Wochen alt sein dürfen, vor dem Gebrauch täglich hergestellt. Die Ablesungen sind von zwei bis drei Personen vorgenommen, in der Regel 25 bis 30 Minuten nach der Venenpunktion. Sofort nach Ablesung wurde die Temperatur des Plasmagemisches durch ein kleines Eintauchthermometer gemessen.

Als Korrektionsfaktor, zur Umrechnung des p_H bei etwa 20°, zur p_H bei 38° habe ich die von *Cullen*, *Cullen* und *Drucker* (8) angegebenen −23 angewandt. Die Größe dieses Faktors wird von anderen Seiten bestritten, ich teile daher auch die unkorrigierten Zahlen mit.

Meine Normalruhewerte (21 Personen) sind 7,26 bis 7,41, die meisten sind zwischen 7,28 und 7,36.

Versuchsprotokoll I. Patient Nr. 6840, weiblich, 46 Jahre, am 15. Oktober 1915 aufgenommen. Diagnose: Parafrenia. Somatisch gesund. Pyknische Konstitution. Menses vor 11 Tagen. Im regio frontalis ein taubeneigroßes Atherom, das auf Wunsch der Patientin am 23. April 1925 entfernt wird.

Um 15 Uhr 5 Minuten. Letzte Mahlzeit 8 Uhr 30 Minuten vormittags. Ist etwa 20 Minuten ruhig sitzen geblieben, gefaßt, zusammengebissen, ohne scheinbaren Affekt. Man punktiert V. med. cubit. dext. sehr leicht ohne Stase; 12 ccm Blut werden in ein Zentrifugierröhrchen aufgenommen, und dann 2 ccm in die p_H-Pipette.

Die p_H-Bestimmung ergab:

15 Uhr 20 Minuten durch „K" abgelesen	15 Uhr 40 Minuten durch „T" abgelesen	
7,51	7,52	= 7,52 bei 20° C
7,52	7,53	= 7,29 bei 38° C

Um 15 Uhr 10 Minuten. Die Äthernarkose mit *Sudecks* Maske fängt an. Man merkt kein Excitationsstadium. Atheromexstirpation.

Um 15 Uhr 30 Minuten. Puls und Respiration regelmäßig, gute G sichtsfarbe. Das Toleranzstadium wird fortgesetzt. Man punktiert V. me cubit. sin. sehr leicht ohne Stase; 12 ccm Blut werden aufgenomme und dann 2 ccm in die p_H-Pipette.

Die p_H-Bestimmung ergab 15 Uhr 50 Minuten:

durch „K" abgelesen	durch „T" abgelesen	durch „H" abgelesen	
7,76	7,76	7,75 bei 22° C	= 7,72 bei 20° C
7,72	7,73	7,72 bei 20,5° C	= 7,49 bei 38° C

p_H ist nicht gegen die saure Seite hin verschoben, sondern ausgesproche nach der *alkalischen* Seite. Eine Acidose kann nicht während der Narkos im Organismus bestanden haben.

Versuchsprotokoll II. Patient Nr. 7239, weiblich, 55 Jahre, am 24. Ma 1919 eingeliefert. Diagnose: Inferioritas mentalis. Psychosis manic depressiva? zurzeit ruhig, weder manisch noch deprimiert. Stimmun grob-gemütlich. Somatisch gesund; pyknische Konstitutionstype. Au Wunsch werden am 9. Mai 1925 zwei kleine Atherome entfernt.

Um 14 Uhr 50 Minuten. Letzte Mahlzeit um 9 Uhr morgens. Große Affekt, sobald sie die Kanüle und Apparate zur Venenpunktion sieht springt vom Stuhl, schreit auf, schlägt mit dem rechten Arm um sicl herum, stampft und schimpft. Erst nach ein Paar Minuten gelingt es, si zu überreden und ihre Aufmerksamkeit abzulenken. Nachdem sie 10 Mi nuten ruhig sitzen geblieben ist, Venenpunktion, von V. med. cub. sin unter nur ganz leichter, vorübergehender Stase, die sofort behoben wird als die ersten Bluttropfen heraustreten; 12 ccm Blut werden in eir Zentrifugierröhrchen aufgenommen und dann 2 ccm in die p_H-Pipette

Puls vor der Venenpunktion 74 regelmäßig, nachher 76.

Respiration vor der Venenpunktion 15 regelmäßig, nachher 15.

Die p_H-Bestimmung, 15 Uhr 15 Minuten, ergab:

durch „K" abgelesen	durch „T" abgelesen	
7,52	7,53 bei 21,5° C	= 7,51 bei 20° C
7,53	7,54 bei 22° C	= 7,28 bei 38° C

Um 15 Uhr. Die Äthernarkose mit *Sudecks* Maske fängt an; Excitationsstadium nur angedeutet. Atheromenexstirpation. Das Toleranzstadium wird fortgesetzt, Respiration und Puls regelmäßig, gute Gesichtsfarbe.

Um 15 Uhr 30 Minuten. Punktion von V. med. cubit. dext. unter nur ganz leichter, vorübergehender Stase, gleich der bei der Venenpunktion vor der Narkose; 12 ccm Blut werden in ein Zentrifugierröhrchen aufgenommen und dann 2 ccm in die p_H-Pipette.

Die p_H-Bestimmung, 15 Uhr 50 Minuten, ergab:

durch „K" abgelesen	durch „T" abgelesen	
7,69	7,68 bei 22,5° C	= 7,66 bei 20° C
7,68	7,67 bei 22° C	= 7,43 bei 38° C

Bei der Bestimmung vor der Narkose können in diesem zweiten Falle zwei Fehlerquellen, die p_H nach der sauren Seite verschieben, wirksam sein, nämlich die leichte Stase und die motorische Unruhe des Pt.

„Die leichte Stase“ ist daher auch bei der Bestimmung während der Narkose mitgenommen, damit der dadurch denkbar acidotisch wirkende Fehler auch bei der zweiten Bestimmung wirksam wäre; übrigens habe ich in zahlreichen Versuchen nie einen merkbaren Fehler durch diese leichte, vorübergehende Stase finden können.

Die durch die plötzliche motorische Unruhe des Patienten eventuell hervorgerufene, acidotisch gerichtete Verschiebung der p_H dürfte in den nachfolgenden ruhigen 10 Minuten aufgehoben sein; in zwei Versuchen über die Wirkung einer „gleichen“, plötzlichen, ein Paar Minuten dauernden motorischen Unruhe habe ich die p_H 0,05 und 0,11 nach der acidotischen Seite verschoben gesehen; in einem dritten Versuch, wo die „Unruhe“ etwa 4 Minuten dauerte, war die p_H 0,04 nach der alkalischen Seite verschoben. Jedenfalls kann der eventuelle Fehler durch die „motorische Unruhe“ in diesem Falle nur gering sein.

Ein dritter, vielleicht schwach acidotisch wirkender Faktor ist der Umstand, daß die beiden Patientinnen vor der Narkose etwa 7 Stunden auf waren, und umhergehende Personen scheinen eine etwas niedrigere (0,02 bis 0,06) p_H zu haben, als wenn sie sitzend ausgeruht sind.

Jedenfalls kann man bei meiner zweiten Patientin nicht behaupten, die p_H habe abgenommen, eine Acidose ist nicht während der Narkose entstanden; wenn p_H verschoben ist, so ist dies in der Richtung einer Alkalose.

In bezug auf die bei *Hunden* während einer Äthernarkose entstandene Acidose nahmen *van Slyke, Austin* und *Cullen* (1) an, diese sei durch das Auftreten saurer Substanzen im Blute oder durch die Entfernung von Basen aus dem Blute bedingt; sie können nicht *Henderson* und *Haggard* (9) zustimmen, die Acidose sei kompensatorisch gegen eine Akapnie, auf die *Henderson* und *Haggard* aus anderen Versuchen schließen.

C. D. und *E. W. Leake* und *Koehler* (10) (1923) glauben nachgewiesen zu haben, die Äthernarkosenacidose beruhe eher auf Entfernung von Basen als auf Entstehung von Säuren im Blute; das gleiche scheint aus *Austin, Cullen, Gram* und *Robinsons* (5) drei Hundeversuchen hervorzugehen (1924).

Ronzoni, Koechig und *Eaton* (4) fanden bei ihren Hunden vermehrte Milchsäure im Blute, und *Stehle* und *Bourne* (11) gaben einen vermehrten Phosphorsäureaustritt aus den Muskeln an.

Cullen, Austin, Kornblum und *Robinson* (12) (1923) führen an: „the fact that the fall in p_H precedes the fall in total (CO_2) indicates that the fall in alkalinereserve is primary and not a withdrawal of base to compensate for excessive loss of CO_2 from hyperventilation“, und sie schließen daher auf eine „unkompensierte Acidose“ und nicht eine „kompensierte Alkalose“.

Gegen diese Tierversuche und die aus ihnen gezogenen Schlußfolgerungen muß eingewandt werden, daß sie sich nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen lassen; denn ***beim Menschen* braucht man nicht *während der Äthernarkose* eine Acidose *zu finden*, *sondern man kann* eine Alkalose *finden*,** was nach *Henderson* und *Haggard* (13) zu erwarten ist.

In bezug auf die Befunde *Caldwell* und *Clevelands* (6) — herabgesetztes Plasmabicarbonat bei äthernarkotisierten Menschen, die *van Slyke, Austin* und *Cullen* (1) als Stütze für die Äthernarkosen-

acidose anzunehmen scheinen — kann vielleicht daran erinnert werd daß Herabsetzung von Bicarbonat im Blute nicht ein Zeichen Acidose zu sein braucht (14).

Wie angegeben ist, fanden im Jahre 1922 *Stehle*, *Bourne* und *Barbour* die Na—K-Ausscheidung durch die Nieren stark herabgesetzt; sie füh diese Tatsache auf die von *Mac Nider* (15) während der Äthernarkose fundene Anurie.

Austin, *Cullen*, *Gram* und *Robinson* (5) fanden eine Verminderung Gesamtbasengehalts des Blutes, *Cloëtta* und *Thomann* (16) eine geri Herabsetzung der Oberflächenspannung, eine Steigerung des K in Plas und Verminderung des Calciums um 8 bis 15 Proz. während der Narko

Diese Versuche sind sämtlich an Hunden ausgeführt.

Norn (17) hat bei einem Manne während zweistündiger Äthernark eine Herabsetzung der K-, Na-, Cl-, N- und Wasserausscheidung gefund

Bei den zwei angeführten Patientinnen habe ich Serum-Ca, -Na und -Eiweiß vor und während der Narkose untersucht. Dabei ha ich Serumcalcium nach *de Waard* (18), Kalium nach *Kramer-Tisdall* (1 Natrium nach *Lebermann* (20) und Protein nach *Holm* und *Tómasson* (bestimmt. Die detaillierte Beschreibung der Methodik wird am ander Orte folgen.

Einen tabellarischen Auszug der Versuchsprotokolle gi Tabelle I.

Leider sind die Versuchsergebnisse nicht so vollständig, wie d wünschenswert wäre, weil man nicht immer Serum genug hatte, u Doppelanalysen in allen Fällen auszuführen.

Aus der Tabelle scheint mir jedoch hervorzugehen, daß man ei Störung der Isoionie während der Äthernarkose beim Menschen find kann.

Da die Na—K-Ausscheidung während der Narkose herabgesetzt i konnte man vielleicht eine Vermehrung dieser Elemente im Blute e warten. Eine solche habe ich nicht gefunden. Die absoluten Zahl der ersten Patientin weisen freilich eine Erhöhung auf; diese liegt ab den Fehlergrenzen der Methoden sehr nahe und ist daher unsich Bei der zweiten Patientin war das Natrium wahrscheinlich bere vor der Narkose ein wenig herabgesetzt — ohne daß dafür ein Gru zu finden ist —; die Narkose ruft in diesem Falle eine Verminderu des Kaliums hervor. In beiden Fällen findet sich eine sehr bedeuten *Zunahme* des Calciums im Serum, im Gegensatz zu den Befunden v *Cloëtta* und *Thomann* (14) an Hunden; im Gegensatz zu ihnen fin ich auch eine deutliche Verschiebung im K—Ca-Quotienten.

Auch diese Resultate lehren, daß die im Hundeversuch gefunden Verhältnisse in bezug auf die Elektrolytveränderungen sich nicht oh weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen lassen.

Tabelle I.

	Ca mg-Proz. Einzelbestimmungen	Ca mg-Proz. Mittelwert	K mg-Proz. Einzelbestimmungen	K mg-Proz. Mittelwert	Na mg-Proz. Einzelbestimmungen	Na mg-Proz. Mittelwert	Protein Proz.	p_H	Hämatokrit	K : Ca	Ca : K
I. Nr. 6840. 23. IV. 1925.											
Vor der Narkose:											
15h 5' : Venenpunktion					350						
15 22 bis 15h 37': Blut zentrifugiert	10,43	10,32	17,61	17,18	335	340	8,77	7,29		0,600	1,664
15 52 : Klares Serum abpipettiert	10,24		16,76		335						
Während der Narkose:											
15h 30' : Venenpunktion					375						
15 46 bis 15h 56': Blut zentrifugiert	13,66	13,66	18,03	18,03		372	8,77	7,49		0,757	1,319
16 00 : Klares Serum abpipettiert					370						
II. Nr. 7239. 5. V. 1925.											
Vor der Narkose:											
14h 50' : Venenpunktion											
15 10 bis 15h 20': Blut zentrifugiert			20,38		275						
15 30 : Klares Serum abpipettiert	11,02	11,02	20,66	20,52	280	277		7,28	45,02	0,536	1,862
Während der Narkose:											
15h 30' : Venenpunktion											
15 40 bis 15h 55': Blut zentrifugiert	12,18		18,11		270						
16 6 ; Klares Serum abpipettiert	12,95	12,56	18,67	18,89	270	270		7,43	44,4	0,682	1,456

Zusammenfassung.

Bei zwei körperlich gesunden Menschen sind p_H im Plasma, C K und Na im Serum vor und während einer Äthernarkose bestimn worden.

p_H weist während der Narkose eine Verschiebung nach der alkal schen Seite hin auf; dies steht im Widerspruch zu früheren, in Tie versuchen gewonnenen Resultaten, die alle für eine acidotische Ve schiebung sprechen.

Die bei den Elektrolyten beobachteten Abweichungen stehen tei weise auch im Gegensatz zu den früher an Tieren ermittelten Date

Die Versuche zeigen, daß man während der Narkose eine nachwei bare Störung der Isoionie des Blutes finden kann.

Literatur.

1) *D. D. van Slyke, J. H. Austin, G. E. Cullen*, Journ. of biol. Chem **58**, 277, 1922. — 2) *R. L. Stehle, W. Bourne, H. G. Barbour*, ebendaselbs **58**, 341, 1922. — 3) *E. J. Bigwood*, Journ. de Physiol. et de Pathol. Général **22**, 72, 1924. — 4) *E. Ronzoni, I. Koechig, E. P. Eaton*, Journ. of biol. Chem **61**, 465, 1924. — 5) *J. H. Austin, G. E. Cullen, H. C. Gram, H. W. Robinson* ebendaselbst **61**, 829, 1924. — 6) *C. A. Caldwell, M. Cleveland*, Surgery Gynecology und Obstetrics **25**, 23, 1917; zitiert bei (1). — *G. E. Cullen* Journ. of biol. Chem. **52**, 523, 1922. — 8) *G. E. Cullen, P. Drucker*, eben daselbst **64**, 221, 1925. — 9) *Y. Henderson, H. W. Haggard*, ebendaselbst **33**, 345, 355, 1918. — 10) *C. D. Leake, E. W. Leake, A. E. Kohler*, ebendaselbst **56**, 319, 1923. — 11) *R. L. Stehle, W. Bourne*, Journ. am. med. ass. **83**, 117, 1924. — 12) *G. E. Cullen, J. H. Austin, K. Kornblum, K. W. Robinson*, Journ. of biol. Chem. **56**, 625, 1923. — 13) *Y. Henderson, H. W. Haggard*, ebendaselbst **48**, 1, 1920. — 14) Medical Research Council, The Acid-Base Equilibrium of the Blood, His Majestys Stationery Office, London **1923**, 22. — 15) *W. de B. Mac Nider*, Journ. of Pharm. u. exper. Therap. **15**, 249, 1920. — 16) *M. Cloëtta* und *Thomann*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **103**, 260, 1924. — 17) *M. Norn*, Kaliums Forhold i Organismen: Aarhus 1925; Dissertation, S. 82 bis 83. — 18) *D. J. de Waard*, diese Zeitschr. **97**, 166, 1919. — 19) *B. Kramer* und *F. F. Tisdall*, Jorn. of biol. Chem. **46**, 339, 1921. — 20) *F. Lebermann*, diese Zeitschr. **152**, 345, 1924. — 21) *Holm* und *Tomasson*, ebendaselbst **159**, 492, 1925.

Über Elektropie. IX.

Zugleich Richtigstellung der Bálintschen Mitteilung „Über Wasserstoffionenkonzentration und Elektropie".

Von

L. Karczag.

(Aus der III. medizinischen Klinik der kgl. ung. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 4. Februar 1926.)

Unter dem Titel „Wasserstoffionenkonzentration und Elektropie" erschien unlängst eine Mitteilung von *M. Balint*[1]).

Die dort angegebenen Versuche enthalten für mich prinzipiell nichts Neues, da sie größtenteils auf meine Veranlassung und unter meiner Leitung auf meinem Arbeitstische ausgeführt wurden. Die Rolle der Wasserstoffionenkonzentration bei den elektropen Umlagerungs- und manchen anderen elektropen Vorgängen war mir ja von Anfang an bekannt und habe ich diesbezüglich seit Jahren sowohl allein wie mit meinen Mitarbeitern Vorversuche ausgeführt[2]). Meine Amerikareise (21. Dezember 1924 bis 20. März 1925) verhinderte mich, diese Frage einer systematischen Untersuchung zu unterwerfen. Nach meiner Rückkehr, als auch *Wankells*[3]) Versuche vorlagen, ließ ich durch Herrn *Bálint* in gewisser Richtung systematische Versuche anstellen, um die komplexen Erscheinungen der elektropen Grundvorgänge näher kennenzulernen. Die Untersuchungen wurden in zwei Hauptgruppen gegliedert. In den ersten untersuchten wir den Einfluß der p_H auf die Farbänderung der elektropen Farbstoffe, in der zweiten den Einfluß der p_H auf die Adsorptionserscheinungen, welche in den elektropen Farbstofflösungen in Gegenwart von adsorbierenden Ladungskörpern ablaufen. Diese Studien sollten uns nicht nur Aufklärung über den Umlagerungs- und Adsorptionsmechanismus geben, sondern zugleich als Anhaltspunkte zur Analyse derjenigen vitalfärberischen bzw. vitalchemoskopischen Vorgänge dienen, welche von uns bereits in ausgedehnten Versuchen auf dem Gebiete der Biologie und Pathologie studiert wurden[4]). Es war

---

1) Diese Zeitschr. 165, H. 4/6, S. 455.

2) *L. Karczag* und *R. Bodó*, ebendaselbst 139, 343, 1923.

3) *Wankell*, Pflügers Arch. 207, 104, 1925.

4) *L. Karczag*, Methoden der Elektropie. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden Abt. 5, T. 2, H. 8.

uns vom Anfang an klar, daß die elektropen Grundvorgänge sich nicht aus einseitigen Gesichtspunkten erklären lassen und daß insbesondere unter vitalen Verhältnissen auch andere physikalisch-chemische Faktoren mit im Spiele sind. Die vorzeitige Publikation gewisser Versuchsergebnisse durch *Bálint* stellte jedoch die ganze Frage in eine ganz einseitige Beleuchtung der elektropen Vorgänge, obzwar ich persönlich den Einfluß der Dielektrizitätskonstanten (*Keller*) der Ionenladungen, der Membranpotentiale, der Dispersitäts- und Ladungsverhältnisse der Farbstoffe usw. stets betont habe und auch die *Höber-Wankell*schen Modellversuche sowie die meinigen mit *Zilahy*[1]) über die Rolle der Zellpermeabilität und schließlich die wichtigen Arbeiten von *Keller* und *Gickelhorn*[2]), in denen der Einfluß des Lösungszustandes der Teilchengröße und des Ladungssinnes auf die Histotropie der Farbstoffe festgestellt wurde, vor Augen hielt. Infolgedessen betrachte ich durch diese Versuche nur gewisse Fragmente aus dem Problemkreise der Elektropie als einigermaßen bearbeitet und durch die Ergebnisse nur bestimmte, in vitro ablaufende elektrope Vorgänge, nicht aber das ganze zusammenhängende System der experimentellen Tatsachen auf biologischem und pathologischem Gebiete geklärt. Ich ließ zwar dem genannten Autor freie Hand, die experimentellen Befunde sowie die Ergebnisse unserer Besprechungen nach seinem Geschmack in jeder beliebigen Form zu verwerten, jedoch bedarf diese in vieler Hinsicht einer Richtigstellung.

I.

Es ist nicht zu bezweifeln, daß bei den elektropen Vorgängen der Wasserstoffionenkonzentration eine Bedeutung zukommt, insbesondere dort, wo eine Verschiebung derselben in Gegenwart von Ladungsstoffen zustande kommt. Es ist aber nicht außer acht zu lassen, daß die Bedingungen der elektropen Umwandlungen eben durch diese Verschiebungen geboten werden und zustande kommen.

Die Angaben über die Entfärbungsdauer der Farbstoffe in *Bálints* Mitteilung sind so zu verstehen, daß die praktische Farblosigkeit oft erst nach mehreren Stunden und mehr erfolgt. Leider kann ich die Entfärbungsdauer der Farbstoffe nicht ergänzend mitteilen, weil sich die Versuchsprotokolle nicht in meinem Besitz befinden. Die Farbstoffe sind keine echten Indikatoren und nur die Carbinole weisen — im Gegensatz zu den Farbstoffen — eine Indikatornatur auf, wie ich dies mit *Bodó* eingehend beschrieben habe. Die Versuche mit Methylrot gehören selbstverständlich nicht hierher, da das Methylrot die Erfordernisse eines elektropen Farbstoffes nicht erfüllt und keine vitalfärberischen Fähigkeiten, wie die elektropen Farbstoffe, aufweist. Das Methylrot ist nur ein Indikator und kein elektroper Farbstoff, wie dies übrigens allgemein bekannt ist.

Bevor ich nun diejenigen Ergebnisse kurz zusammenfasse, welche aus der *Bálint*schen Mitteilung zu verwerten sind, möchte ich noch

---

[1]) *L. Karczag* und *N. Zilahy*, diese Zeitschr. **162**, H. 1/2, 1925.
[2]) *J. Gicklhorn* und *R. Keller*, ebendaselbst **153**, H. 1/2, 1924.

bemerken, daß die Versuche über die elektrope Adsorption dürftig und unvollständig sind und sie keinesfalls als publikationsreif bezeichnet werden können. Aus den Versuchen dieses Themas sind nur folgende Feststellungen verwertbar, und sie berechtigen uns nur zur Aufstellung gewisser Schlüsse:

1. Verwertbar ist die Bestimmung des Entfärbungsgebiets der elektropen Farbstoffe durch *Bálint*: (0,2 Proz. Farbstofflösung; die eingeklammerten Zahlen bedeuten die praktische Farblosigkeit).

Rotviolett . . . . . p_H	4,1		bis		8,3
Wasserblau	4,6	bis	(7,2)	bis	8,7
Baumwollblau . . .	4,8	„	(7,2)	„	8,8
Fuchsin S	4,8	„	(8,8)	„	9,3
Anilinblau.	4,8	„	(9,3)	„	10,0
Lichtgrün	6,8	„	(9,7)	„	10,4
Pyrrholblau	8,5	„	(11,3)	„	12,4
Säureviolett	9,9		bis		12,0
Methylviolett . . .	1,3	„	—	„	10,0 bräunlich 12,6 rein gelb, verblaßt weiter.

2. Die Feststellung, daß die Empfindlichkeitsreihenfolge der elektropen Farbstoffe gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration mit der von mir bereits festgestellten Ladungsreihenfolge des negativ geladenen Farbstoffsystems übereinstimmt.

3. Die Feststellung, daß sich die Wasserstoffionenkonzentration der Farbstofflösungen durch Kochen, Kohlestäbchen, Wasserstoffsuperoxyd gegen die alkalische Seite verschiebt.

4. Die Feststellung, daß die umlagernde Wirkung einer weiteren großen Anzahl von Ladungsstoffen sowohl in Richtung des Farbstoffs, wie auch in Richtung des Carbinols mit einer Änderung der p_H im Zusammenhang steht.

5. Und schließlich: Daß im allgemeinen Umlagerungsgeschwindigkeit, elektrostatische Ladung, Dispersität der elektropen Farbstoffe und die Empfindlichkeit gegen Wasserstoffionenkonzentration zusammenhängende Eigenschaften sind.

II. Versuche über Wasserblau.

Tropft man eine konzentrierte Natronlauge zu einer 0,1proz. Wasserblaulösung, so schlägt zunächst die blaue Farbe ins schillerrote um und erst dann entfärbt sich langsam die Flüssigkeit. Tropft man aber eine verdünnte n/10 Natronlauge zur Farbstofflösung, so wird diese ohne anders gefärbte Zwischenstufen entfärbt.

Das Studium dieses äußerst wichtigen Phänomens, an dem sich bereits vor Jahren Dr. *Bodó* und später Dr. *Bálint* beteiligten, ergab

folgende interesssante, sowohl physikalisch-chemisch, wie biologisch wichtige Tatsachen.

Wasserblau ist im Gebiete	p_H	etwa	4	bis	7,4	blau,
	p_H	„	7,4	„	9,9	farblos,
	p_H	„	10	„	12	schillerrot.

Wird also zur Wasserblaulösung verdünnte Natronlauge oder Wasserstoffsuperoxyd gegeben, welche die p_H der Lösung höchstens bis 9 verschieben, so entsteht die farblose Carbinolbase. Dasselbe trifft zu, falls man die Farbstofflösung aufkocht oder verschiedene Suspensoide oder Kolloide zusetzt, welche die p_H der Farbstofflösung bis höchstens 9,5 zu verschieben imstande sind. Gibt man aber konzentrierte Natronlauge hinein, welche in der Farbstofflösung eine Verschiebung der p_H über 9,0 bewirkt, so wird die Farbe direkt schillerrot. Wir können daher eine vorher bei etwa 7,4 bis 9,9 *farblos* gewordene originale Wasserblaulösung durch Zutropfen einer konzentrierten *Natronlauge*, welche die p_H auf 10 bis 12 erhöht, *ins schillerrote umwandeln*. Das Wasserblau besitzt also einen doppelten Umschlagspunkt. Die schillerrote Farbe springt auf Säurezusatz ins Blaue zurück, sobald die p_H zwischen 4 bis 7 gehalten wird. Ebenso schlägt die farblose Form auf Säurezusatz ins Blaue um.

Anders gestalten sich jedoch die Verhältnisse, sobald man die farblose Carbinolbase nicht direkt aus der Originallösung des Wasserblaus, z. B. durch Kochen, sondern durch Kohlestäbchen herstellt. In diesem Falle ist ein Zusatz von konzentrierter Natronlauge bzw. Erhöhung der p_H bis auf 10 bis 12 erfolglos, ein Farbumschlag ins schillerrote findet nicht statt. Regeneriert man aber aus der Carbinollösung die blaue Farbe des Wasserblaus durch Zusatz von Säuren (p_H 4 bis 7,4) und setzen wir nun zu diesem System konzentrierte Natronlauge, so schlägt die Farbe sofort ins schillerrote um.

Tiefer in den Umwandlungsmechanismus der Farbenänderungen einzudringen, lag nicht in unserer Absicht, die gewonnenen Erkenntnisse genügten für uns, um für eine Reihe der beobachteten elektropen Erscheinungen eine Erklärung zu geben. Den Wasserblauversuchen könnte aus folgenden Gesichtspunkten eine Wichtigkeit zugemessen werden; sie lehren, daß infolge elektrostatischer Einflüsse weder in vitro noch in vivo ein p_H über 10 vorkommt, da in diesem Falle nicht das Auftreten der farblosen Carbinolform, sondern der schillerroten (echten Carbinolbase) Modifikation beobachtet werden müßte, wie es jedoch nie der Fall war.

Das farblose Carbinol, welches nach Verabfolgen des Wasserblaus entsteht und im Blute und in Zellsäften vorhanden ist, entspricht derjenigen Carbinollösung, welche aus Wasserblau durch Kochen hergestellt wird, und nicht derjenigen, welche durch Kohlestäbchen dar-

gestellt wird. Versetzt man das farblose Blutserum der mit Wasserblau behandelten Tiere mit starker Natronlauge, so entsteht die schillerrote Farbe, welche wir bei durch Kohlestäbchen dargestellten Carbinolen nie erreichen konnten. Behandelt man einen farblosen Gefrierschnitt irgend eines Organs, welches in den Zellen und den Bindegeweben Wasserblaucarbinol in gebundener, adsorbierter Form enthält, mit konzentrierter Natronlauge, so beobachtet man eine leichte schwindende Rotfärbung. Damit ist die Möglichkeit erwiesen, daß das Carbinol innerhalb des Organismus ebenfalls mit roter Farbe regeneriert werden könnte, falls irgendwo ein p_H 10 bis 12 vorhanden wäre. Untersucht man einen solchen mit konzentrierter Natronlauge behandelten carbinolhaltigen Gefrierschnitt, so ist unter dem Mikroskop im Gegensatz zu den mit Säure behandelten blauregenerierten Gefrierschnitten nichts sichtbar, weil durch den Zusatz von Natronlauge das vitale Adsorptionsoptimum der Carbinole überschritten wurde.

III. Versuche über die elektrope Regenerationsadsorption.

Damit eine farbige elektrope Regenerationsadsorption des Farbstoffs durch Casein erzielt werde, muß ein p_H zwischen 5 bis 5,5 vorhanden sein. Wir begegnen aber im Tierkörper physikalisch nie einer farbigen Regeneration der Carbinole. Eine solche ist von uns nur in den Makrophagen (*Kupfer*sche Sternzellen), in den Epitheloidzellen *Goldmanns* der Tuberkel, in gewissen nekrotischen Teilen des Mäusecarcinoms und des Meerschweinchentuberkels, sowie in den Nierenepithelnekrosen der Meerschweinchen beobachtet worden[1]). Diese Tatsachen bewiesen, daß im lebenden Organismus physiologisch nie, pathologisch nur unter bestimmten Bedingungen ein p_H unter 5 bis 5,5 vorhanden ist, denn in diesem Falle sollten die Carbinolbasen unter Adsorption eine vitale Regeneration zum betreffenden Farbstoff erfahren. Wir folgerten bereits aus unseren chemoskopischen Versuchen (nur die elektrostatischen Ladungen vor Augen haltend), daß im lebenden Organismus keine Kolloide vorhanden sind, deren elektrostatische Ladung sich in der Höhe des Caseins bewegen würde. Alle diese Tatsachen, welche sich gegenseitig erklären und ergänzen, weisen darauf hin, daß sich die elektive Adsorption der farblosen Carbinole (Typus der elektropen

---

[1]) *L. Karczag* und *L. Paunz*, Zeitschr. f. klin. Med. 98, H. 5/6, 1924; *L. Karczag* und *L. Barok*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 60, H. 2, 1924; *L. Karczag*, *L. Teschler* und *L. Barok*, Zeitschr. f. Krebsf. 21, H. 4, 1924; *L. Karczag* und *L. Németh*, ebendaselbst 22, H. 5, 1924; *L. Karczag*, *L. Paunz* und *L. Németh*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 41, H. 1/3, 1924; *L. Karczag*, *L. Paunz* und *N. Zilahy*, ebendaselbst 41, H. 1/3, 1924; *L. Karczag*, *L. Paunz* und *G. Barok*, ebendaselbst 41, H. 1/3, 1924; *L. Karczag*, *L. Paunz* und *P. Roboz*, ebendaselbst 41, H. 1/3, 1924.

Adsorption) im Tierkörper nach aller Wahrscheinlichkeit bei p_H 5,5 bis 9,4 abspielt, und daß das Adsorptionsoptimum des regenerierten Farbstoffs (Typus der elektropen Regenerationsadsorption) bei einer anderen p_H liegt als dasjenige der Carbinole, daß jenes von dem Neutralpunkt mehr entfernt, dieses dagegen näher liegt.

Je höher das Entfärbungsbereich, desto schlechter, je niedriger, desto besser die vitale Adsorption der Carbinole. Da die Blutkolloide selbst bei einer p_H 7,4 die Carbinole nicht adsorbieren, so dürfte die Wasserstoffionenkonzentration der nicht carbinolotropen parenchymatösen Organe, Blutzellen und Gewebe usw. höher gelegen sein, als die Wasserstoffionenkonzentration des Blutserums. Daraus geht jedoch die wichtige Tatsache hervor, daß das vitale Adsorptionsoptimum der Carbinole nicht zwischen p_H 5,5 bis 9,4, sondern zwischen p_H 5,5 und 7,4 liegen muß. Wir können jedoch in unserer Analyse weitergehen. Da nämlich die Carbinole als farblose Verbindungen abgefangen und gespeichert werden, so ist es klar, daß die p_H der carbinolophilen Elemente bei dem Umschlagspunkt des Lichtgrüncarbinols p_H 6,8 als Minimum gelegen ist. *Das vitale Adsorptionsoptimum der elektropen Carbinole dürfte also zwischen 5,5 bis 6,8 liegen.*

Was nun das Optimum der vitalen Regenerationsadsorption betrifft (Makrophagen, Epitheloidzellen, Nekrosen), so kann als niedrigster Punkt der p_H der betreffenden Elemente tiefer als der Umschlagspunkt des Wasserblaucarbinols p_H 4,6 geschätzt werden. *Zwischen p_H 4,6 bis 5,5 ist also das Optimum der vitalen Regenerationsadsorption.*

Es soll ausdrücklich hervorgehoben werden, daß diese indirekten Folgerungen auf vitale Wasserstoffionenkonzentrationen der Zellen und Gewebsflüssigkeiten nur unter der Voraussetzung gültig sind, daß die Entfärbungs- und Regenerationserscheinungen sowie die übrigen elektropen Adsorptionen im Blute und in den Gewebssäften das gleiche Verhalten zeigen, wie in vitro im Falle des Wassers als Dispersionsmittel. Nur unter dieser Voraussetzung geben uns die obigen Folgerungen Richtlinien für die Beurteilung der Wasserstoffionenkonzentration bzw. ihrer Verteilung im Organismus. Der heuristische Wert solcher Folgerungen liegt auf der Hand, da sie für den Biologen trotz der relativen Zahlenverhältnisse Anhaltspunkte für das Verständnis zahlreicher biologischer Vorgänge bieten.

Wir müssen auch bedenken, daß das vitale Umschlagsbereich der Farbstoffe ein anderes ist als diejenigen, welche in vitro beobachtet werden. Man könnte sagen, daß die elektropen Farbstoffe ohne Rücksicht auf ihre in vitro festgestellten Umschlagsbereiche zu denselben Maximum- und Minimumwerten gebracht werden und ihnen somit im Tierkörper gewisse Konstanten aufgezwungen werden. Es ist also einerlei, ob der Farbstoff sein Umschlagsbereich in vitro, wie z. B.

Fuchsin S, p_H 4,9 bis 8,3 beträgt, sein physiologischer Umschlagsbereich wird im Organismus auf 5,5 und 7,4 gebracht. In gleicher Weise werden zu denselben Werten die verschiedensten Umschlagsbereiche der verschiedensten elektropen Farbstoffe nivelliert. Trotz dieser Nivellierung kommen aber die verborgenen Eigenschaften der Materie, die „spezifische" z. B., in dem Ablauf von Elektivitätsprozessen zum Vorschein. Kreisen z. B. die Carbinole des Fuchsin S und Lichtgrüns im Blute, so nimmt die kollagene Faser vielmehr das Fuchsin S-Carbinol und die elastische Faser das Lichtgrüncarbinol auf. Da das Lichtgrün eine geringere negative Ladung als das Fuchsin S besitzt, so liegt auch das Optimum der elektropen Adsorption beim Lichtgrün in dem weniger sauren Gebiet als bei Fuchsin S, weshalb auch die elastische Faser weniger sauer sein dürfte als die kollagene.

Wir können also aus den experimentellen Ergebnissen unter der Voraussetzung, daß bei den elektropen Umwandlungen nur die Wasserstoffionenkonzentration die primäre Rolle spielt, folgende Schlüsse ziehen:

1. Die vitale Carbinolotropie (als Typus der elektropen Adsorption) spielt sich unter physiologischen Verhältnissen zwischen p_H 5,5 und 6,8 ab.

2. Die p_H der elastischen Faser ist eine niedrigere als die der kollagenen sowie auch derjenigen Elemente, welche zu Lichtgrün eine geringere Affinität aufweisen, wie zum Fuchsin S und Wasserblau (Nierenepithelien, Ovarienfollikel usw.).

3. Die pathologische Carbinolregeneration (als Typus der elektropen Regenerationsadsorption) spielt sich zwischen p_H 4,6 und 6,5 ab. In der Höhe vom p_H 4,6 bewegt sich die p_H der Makrophagen, der Epitheloidzellen *Goldmanns*, der nekrotischen carbinolotropen Elemente der Tuberkel, der Carcinome, der Nierenepithelien, Nekrosen usw.

4. Die p_H der nicht carbinolotropen Elemente liegt physiologisch und pathologisch über p_H 6,8.

Für diese Folgerungen sind bereits die gemachten Voraussetzungen mitgeteilt worden. Inwieweit andere Faktoren, wie z. B. die Dielektrizitätskonstante, die Ionenladungen usw., eine Rolle spielen, muß seitens der physikalischen Chemie gründlich bearbeitet werden. Alle diese Gedanken mußte ich trotz Mangel von exakten, unanfechtbaren Experimenten niederlegen, um die Bearbeitung der Probleme der Elektropie in die richtige Bahn zu lenken.

Über die Wirkung des Mangans auf die alkoholische Gärung.

Von

M. Rosenblatt und **A. (J.) March.**

(Aus dem wissenschaftlichen Forschungsinstitut für Chemie und dem biochemischen Laboratorium des Technikums für angewandte Chemie in Odessa.)

(Eingegangen am 4. Februar 1926.)

Vor etwa 20 Jahren hat *Gabriel Bertrand* auf die bedeutende Rolle hingewiesen, welche außerordentlich geringe Mengen mancher Elemente (Metalle und Metalloide) in der organischen Natur spielen.

Viele Arbeiten analytischen Charakters erwiesen das unbedingte Vorhandensein mancher Elemente (Mn, Zn, B, As u. a.) in Organismen des Pflanzen- und Tierreichs.

Eine andere Reihe von Arbeiten hat Licht in die Bedeutung dieser Elemente für normales Funktionieren der Organismen gebracht, wobei sie augenscheinlich die Rolle von Katalysatoren physiologischer Prozesse spielen. Manche dieser katalytischen Elemente bilden einen integrierenden Bestandteil der Fermente, ohne welchen die Wirkung derselben gar nicht hervortritt.

Aus dieser Gruppe von Elementen ist das Mangan, was seine Verbreitung in der Natur anlangt, sowie auch vom Standpunkte seiner Rolle in physiologischen Prozessen aus am gründlichsten studiert worden.

Die ersten Arbeiten in dieser Hinsicht zeigten, daß das Mangan ein unentbehrlicher Bestandteil des oxydierenden Ferments der Laktase ist (1).

Weitere Untersuchungen betrafen die wohltätige Wirkung des Mn auf das Wachstum mancher Mikroorganismen (2) und höherer Pflanzen (3), sowie auf manche biochemische Prozesse (Essig- und Alkoholgärung, Hydrolyse der Fette) (4). Der Einfluß des Mangans auf das Wachstum der Hefe und auf die Alkoholgärung diente als Objekt für eine Reihe von Untersuchungen (*Kayser* und *Marchand*, *Bokorny*, *March*).

Die Resultate dieser Untersuchungen erwiesen eine allgemeine aktivierende Wirkung des Mn im Prozeß der Alkoholgärung, was aber die quantitativen Angaben betrifft, besonders Hinweise auf Optimalkonzentrationen, so unterscheiden sich dieselben bei *Kayser* und *Marchand* (5) etwas von denjenigen des einen von uns (6).

Da die genannten Autoren verschiedene Arbeitsmethoden anwandten, was auch der Grund einer gewissen Nichtübereinstimmung

der Resultate sein dürfte, unternahmen wir vorliegende Untersuchung zu folgendem Zwecke: Erstens Beobachtung des Einflusses von Mn auf die Alkoholgärung in Anwesenheit von verschiedenen Heferassen (Bäckerei-, Bier-, Wein- und Cidrehefen), sowie auch ohne lebendige Hefe (Mazerationssaft nach *Lebedew*) und zweitens Bestimmung des Einflusses verschiedener Konzentration von zuckerigem Substrat auf die Wirkung des gegebenen katalytischen Metalls.

Der erste Teil unserer Arbeit ergab Resultate, welche dem Grundsatz von der allgemein aktivierenden Wirkung des Mn entgegengesetzt sind. In vielen Fällen war die Wirkung dieses Metalls auf die Alkoholgärung nicht stimulierend, sondern im Gegenteil hemmend. Wir haben folgende Heferassen untersucht: Die Weinheferasse „Schloß Johannisberg" (Nr. 59), die Weinheferasse „Bessarabische" (Nr. 50), die „Apfelweinheferasse" (Nr. 36) (erhalten von der Odessaer Weinbaustation W. E. Tairoff), die Rasse gepreßter „Bäckereihefe" und die Rasse der Bierhefe „Frohberg" (erhalten von der Fabrik des Odessaer „Nahrungsmitteltrust"). Außerdem ist von uns der Hefesaft untersucht worden, welcher durch Trocknen und Mazeration der Bierhefe „Frohberg" bereitet wurde.

Die Methodik der Arbeit für jede Versuchsreihe war folgende: Man nahm eine Reihe Kolbenflaschen von 60 ccm Inhalt aus Jenaer Glas, in welchen sich gleiche Zuckermengen befanden (Saccharose oder Glucose), gelöst entweder in zweimal destilliertem Wasser oder in Nährflüssigkeit (Hefebouillon oder Weintraubensaft), dann wurden in dieselben Gefäße verschiedene Mengen Mangan hinzugefügt in Form von Sulfat oder Nitrat. Dabei hatte jede Versuchsreihe ihre Kontrollen ohne Hinzufügung von Mn. Die gefüllten Kolben wurden sterilisiert, dann wurden sie mit der betreffenden Hefekultur beimpft (mit Hilfe einer Pasteurpipette, wenn das Substrat aus zuckerigem Nährmedium bestand; wenn aber die Versuche in einer Zuckerlösung in reinem destillierten Wasser ausgeführt wurden, waren die Mengen der hinzugefügten Hefe bedeutend größer; in solchen Fällen nahm man abgewogene Hefemengen und fügte dieselben zur Flüssigkeit hinzu), mit Gärungsventilen versehen und gewogen.

Die gewogenen Kolben wurden in einem Thermostaten untergebracht bei $t^0 = +26^0$ und nach dem Entweichen von Kohlensäure, was mittels periodischer Gewichtsbestimmung der Kolben festgestellt wurde, wurden die Angaben über das Gärungstempo zusammengestellt. Nachdem in den meisten Versuchen etwa 60 Proz. Zucker zersetzt waren, unterbrach man die Gärung gleichzeitig in allen Kolben dieser Versuchsreihe, indem man $HgCl_2$-Lösung hinzufügte. Dann, nach Fällung des Quecksilbers durch Zinkstaub unter Zusatz von Essigsäure, wurden die Flüssigkeiten filtriert, zu einem gewissen

Volumen gebracht und der rückständige Zucker nach der *Bertrand*schen Methode bestimmt (bei Versuchen mit Saccharose nach der Inversion). Die Resultate der Versuche des ersten Teiles unserer Arbeit sind in folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle I.

Weinheferassen.

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	„Johannisberg" Nr. 59		„Bessarabische" Nr. 50	
		Dauer der Versuche 3 Tage		Dauer der Versuche 2 Tage	
		Vergorener Zucker g	Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.	Vergorener Zucker g	Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	25 cm^3 pasteurisierten Weinmostes, enthaltend 3,73 g Zucker, d. h. 14,92 Proz.	2,10	100,0	2,44	100,0
0,0005		—	—	2,27	93,0
0,0010		2,67	127,1	2,27	93,0
0,0030		—	—	2,26	92,6
0,0060		2,48	118,1	2,28	93,4
0,0100		2,48	118,1	2,29	93,8
0,0200		2,45	116,7	2,32	95,0
0,0500		2,35	111,9	2,19	89,8
0,1000		2,13	101,4	1,98	81,1

Tabelle II.

„Apfelwein"-Hefe (Nr. 36).

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	Dauer der Versuche 3 Tage	
		Vergorener Zucker g	Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	25 ccm pasteurisierten Weinmostes, enthaltend 3,73 g Zucker, d. h. 14,93 Proz.	3,04	100,0
0,0005		2,98	98,0
0,0010		2,95	97,0
0,0030		2,90	95,4
0,0060		2,91	95,7
0,0100		2,82	92,8
0,0200		2,80	92,1
0,0500		2,61	85,9
0,1000		2,32	76,3

Die angeführten Angaben (Tabelle I bis VI) zeigen, daß die aktivierende Wirkung des Mn auf die Alkoholgärung keinen allgemeinen Charakter trägt; in vielen Fällen ist Mn ein die Alkoholgärung hemmendes Element (Rasse der Weinhefe „Bessarabische",

„Apfelweinhefe", Bierhefe „Frohberg", „Bäckereihefe", gepreßte). Seine Wirkung machte sich dann in folgender Weise geltend: Bis zu einer gewissen Konzentration übt das Vorhandensein dieses Metalls keine bemerkbare Wirkung auf Charakter und Tempo der Gärung aus, sodann tritt seine hemmende Eigenschaft hervor, welche bei Zunahme der Mn-Konzentration sich immer mehr verstärkt.

Die von uns gefundenen Tatsachen über verschiedenes Verhalten der Erreger alkoholischer Gärung zu Mn hängen augenscheinlich von der verschiedenen Herkunft der Hefe ab, welche diese Fermente enthält. So hat sich für zwei Weinheferassen, „Schloß Johannisberg" (nach dem Katalog der Odessaer Weinbaustation, Nr. 59) und „Bessarabische" (nach dem Katalog der Odessaer Weinbaustation Nr. 50), im ersten Falle die Anwesenheit von Mn als ein die Gärung stimulierender Faktor erwiesen (Tabelle I), was in Untersuchungen von *March* im Jahre 1924 gefunden war; für die zweite Rasse („Bessarabische") erzeugte im Gegenteil die Anwesenheit von Mn eine die Fermente der Gärung hemmende Wirkung (Tabelle I). Auf die von uns untersuchte „Apfelweinhefe" (Katalog der Odessaer Weinbaustation Nr. 36) übte das Mn eine lähmende Wirkung aus (Tabelle II), während bei den Versuchen von *Kayser* und *Marchand* (7) dasselbe die Gärung aktivierte.

Besonders interessant ist die Tatsache der verschiedenen Wirkung des Mn auf die Gärung, hervorgerufen durch Hefesaft, bereitet durch Mazeration nach der Methode von *Lebedew* bei unseren Versuchen (Tabelle VI) und bei den Versuchen von *Kayser* (8); diejenigen Konzentrationen von Mn, welche bei den Versuchen von *Kayser* besonders günstig für die Gärung waren, hemmten dieselbe stark bei unseren Versuchen.

Tabelle III.

Bierhefe „Frohberg" (untere).

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	Dauer der Versuche 3 Tage: Vergorener Zucker g	Dauer der Versuche 3 Tage: Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.	Medium	Dauer der Versuche 4 Tage: Vergorener Zucker g	Dauer der Versuche 4 Tage: Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	25 ccm pasteurisierten Mostes, enthaltend 3,73 g Zucker	2,54	100,0	20 ccm Hefebouillon mit 4 g Glucose	3,03	100,0
0,0005		2,45	96,5		2,70	89,1
0,0010		2,54	100,0		3,01	99,3
0,0030		2,47	97,2		2,95	97,3
0,0060		2,39	94,1		2,94	97,0
0,0100		2,43	95,7		2,94	97,0
0,0200		2,43	95,7		2,93	96,7
0,0500		2,16	86,2		2,25	74,3
0,1000		1,49	58,7		1,26	41,6

Tabelle IV.

Gepreßte „Bäckereihefe“ (ober).

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	Dauer der Versuche 16 Tage		Medium	Dauer der Versuche 12 Tage		Medium	Dauer der Versuche 3 Tage	
		Vergorener Zucker g	Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.		Vergorener Zucker g	Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.		Vergorener Zucker g	Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	20 ccm destilliertes Wasser dazu 5 g Saccharose und 0,25 g gepreßte Hefe	3,45	100,0	20 ccm Hefebouillon dazu 5 g Saccharose und 0,1 g gepreßte Hefe	2,69	100,0	25 ccm pasteurisierten Weintraubenmostes, enthaltend 3,73 g Zucker	1,91	100,0
0,001		3,33	96,5		2,68	99,6		1,89	98,9
0,003		3,06	88,7		—	—		—	—
0,006		2,76	80,0		2,68	99,6		1,84	96,3
0,010		2,42	70,1		2,61	97,0		1,82	95,3
0,015		2,42	70,1		—	—		—	—
0,025		2,42	70,1		2,25	83,6		1,80	94,2
0,050		2,32	67,2		1,86	69,1		1,80	94,2
0,100		1,87	54,2		1,38	51,3		1,78	93,2
0,500		1,62	47,0		1,17	43,5		0,83	43,5
2,000		—	—		0,78	29,0		0,20	10,5

Tabelle V.
Gepreßte „Bäckerreihefe“ (ober).

Konzentration des Mn in Prozenten [hinzugefügt als $Mn(NO_3)_2$]	Medium	Dauer der Versuche 11 Tage: Vergorener Zucker g	Dauer der Versuche 11 Tage: Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.	Medium	Dauer der Versuche $3^3/_4$ Tage: Vergorener Zucker g	Dauer der Versuche $3^3/_4$ Tage: Vergorener Zucker in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	25 ccm destilliertes Wasser, dazu 5 g Saccharose mit 0,25 g gepreßte Hefe	3,66	100,0	25 ccm pasteurisierten Weintraubenmostes, enthaltend 3,73 g Zucker	2,71	100,0
0,001		3,60	98,4		2,70	99,6
0,003		3,58	97,8		2,57	94,8
0,006		3,50	95,6		2,40	88,6
0,010		3,44	94,0		2,38	87,8
0,025		3,34	91,3		2,37	87,5
0,050		3,17	86,7		2,35	86,7
0,100		2,61	71,3		2,30	84,8
0,500		2,21	60,4		0,33	12,2

Tabelle VI.
Hefesaft, bereitet aus Bierhefe (Mazeration nach *Lebedew*).

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	Dauer der Versuche 6 Tage: Menge der ausgeschiedenen CO_2 g	Dauer der Versuche 6 Tage: Menge der ausgeschiedenen CO_2 in Beziehung zum Kontrollversuch Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	12 ccm Hefesaft nach *Lebedew*, dazu 5 g Saccharose + Toluol	0,47	100,0
0,001		0,43	91,5
0,006		0,47	100,0
0,010		0,48	102,1
0,020		0,43	91,5
0,050		0,37	78,9
0,100		0,24	51,1

Eine derartig verschiedene Wirkung des Mn auf die Alkoholgärung ist der Säurewirkung auf dieselbe analog (Mr. und Mme. *M. Rosenblatt*) (9), (*Johannesson*) (10) und ebenfalls der Säurewirkung auf Invertasen verschiedener Herkunft (*G. Bertrand* und Mr. und Mme. *M. Rosenblatt*) (11).

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß auf den allgemeinen Gang der lähmenden Wirkung des Mn weder verschiedene Medien (nährende und einfache Wasserlösungen von Zucker), noch die Form, in welcher das Mn hinzugefügt wurde [$MnSO_4$ und $Mn(NO_3)_2$] eine besondere Wirkung ausübten.

Unsere Angaben über die verschiedene Wirkung des Mn auf die Alkoholgärung je nach der Heferasse bestätigen die Ansicht eines von uns in gemeinsamer Arbeit mit Mme. *M. Rosenblatt*, daß die Sensibilität der von Hefe erzeugten Fermente je nach der Herkunft der Hefe und der Zusammensetzung des Mediums sich ändern kann.

Die Analogie zwischen der lähmenden Wirkung des Mn und der Wirkung von Säuren auf die Alkoholgärung bewog uns, unsere Versuche

Tabelle VII.

Gepreßte „Bäckereihefe“ (ober).

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	10 Proz. Zucker		20 Proz. Zucker		30 Proz. Zucker		40 Proz. Zucker		50 Proz. Zucker		60 Proz. Zucker	
		Die Mengen des vergorenen Zuckers in Grammen und in Prozenten in Beziehung zu den Kontrollversuchen											
		g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	Wasserlösung einer entsprechenden Menge Saccharose + 0,250 g gepreßter Hefe	1,67	100,0	3,45	100,0	3,27	100,0	3,60	100,0	1,08	100,0	0,48	100,0
0,001		1,60	95,8	3,33	96,5	3,07	93,9	3,50	96,9	—	—	0,46	95,8
0,003		—	—	3,06	88,7	—	—	—	—	1,08	100,0	—	—
0,006		1,29	77,2	2,76	80,0	3,17	96,7	3,29	93,9	0,85	78,7	0,45	93,8
0,010		1,08	64,7	2,42	70,1	3,06	93,6	3,29	93,9	0,95	88,0	0,45	93,8
0,015		—	—	2,42	70,1	3,07	93,9	—	—	—	—	—	—
0,025		0,86	51,5	2,42	70,1	2,90	88,7	2,97	82,5	0,95	88,0	0,44	91,7
0,050		0,77	46,1	2,32	67,2	2,53	77,4	2,92	81,1	—	—	0,44	91,7
0,100		0,76	45,5	1,87	54,2	2,11	64,6	2,81	78,2	0,62	75,9	0,44	91,7
0,500		0,67	40,1	1,62	47,0	2,07	63,3	2,81	78,2	—	—	0,42	87,1
1,000		—	—	—	—	2,00	61,2	—	—	—	—	—	—
2,000		0,54	32,3	—	—	—	—	1,79	49,7	—	—	0,26	54,1

zur Aufklärung der Abhängigkeit zwischen der Wirkung des Mn und der Zuckerkonzentration im gärenden Medium forzusetzen.

Mr. und Mme. *M. Rosenblatt* (12) haben in ihrer Arbeit über die Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der lähmenden Wirkung der Säuren gefunden, daß der Zucker die Hefezymase gegen die Wirkung der Säuren schützt: Die Steigerung der Zuckerkonzentration schwächt die lähmende Wirkung der Säuren. Eine ähnliche Abhängigkeit wurde von uns zwischen der lähmenden Wirkung des Mn und der Zuckerkonzentration beobachtet: Bei Erhöhung der Zuckerkonzentration steigern sich dementsprechend die Mengen des Mn, welche eine gleich große lähmende Wirkung auf die Gärung ausüben; andererseits, bei Anwesenheit von gleichen Mn-Mengen, steigern bedeutend die Mengen vergorenen Zuckers (Prozente in Beziehung zu Kontrollversuchen), bei Erhöhung der Zuckerkonzentration im gärenden Medium. Das ist aus folgender Tabelle zu ersehen.

Aus der Tabelle VII sieht man z. B., daß, wenn die Zuckerkonzentration um das Sechsfache erhöht wird (von 10 bis 60 Proz.), zur Erhaltung des gleichen lähmenden Effekts die Mn-Konzentration 80mal erhöht werden muß (von 0,025 bis 2,0 Proz.). Ein anderes Beispiel zeigt, daß in einer 10proz. Zuckerlösung die Menge des ausgegorenen Zuckers in Gegenwart von 0,1 Proz. Mn um 54,5 Proz. vermindert worden ist (in Beziehung zum Kontrollversuch), während in einer 30proz. Zuckerlösung unter denselben Bedingungen die Verminderung des Gärungstempos etwa 35,4 Proz. beträgt, in einer 40proz. Zuckerlösung 21,8 Proz. und in einer 60proz. Zuckerlösung nur 8,3 Proz.

Weiterhin interessierten wir uns für die Abhängigkeit zwischen der Zuckerkonzentration und der aktivierenden Wirkung des Mn (Rasse „Schloß Johannisberg").

Die Resultate dieser Versuche sind ebenfalls durch eine Tabelle illustriert.

Tabelle VIII.

Weinheferasse „Schloß Johannisberg" Nr. 59.

Konzentration des Mn in Prozenten (hinzugefügt als $MnSO_4$)	Medium	15 Proz. Zucker		20 Proz. Zucker		40 Proz. Zucker	
		Die Mengen vergorenen Zuckers in Grammen und in Prozenten in Beziehung zum Kontrollversuch					
		g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
Kontrolle (ohne Mn)	Pasteurisierter Weintraubensaft, enthaltend 15 Proz. Zucker + entsprechende Glucose-Menge	2,10	100,0	3,53	100,0	4,67	100,0
0,001		2,67	127,1	4,12	116,7	5,28	113,1
0,006		2,48	118,1	4,10	110,1	5,17	110,7
0,010		2,48	118,1	4,06	115,0	4,76	101,9
0,020		2,45	116,7	3,99	113,1	5,12	109,6
0,050		2,35	111,9	4,09	115,8	4,47	95,7
0,100		2,13	101,4	3,07	87,0	4,35	93,1

Die angeführten Versuche lehren, daß anwachsende Zuckerkonzentrationen nur einen schwachen Einfluß auf die aktivierende Wirkung des Mn ausüben, eher läßt sich eine Schwächung dieses Einflusses feststellen. So schwächt der Zucker augenscheinlich die lähmende sowie die aktivierende Wirkung des Mn auf die Alkoholgärung, er tritt als Regulator dieser Wirkungen auf und übt seine Schutzwirkung auf die Fermente gegen dieses Metall aus.

Auf eine solche Schutzrolle des Zuckers gegen die Wirkung des Kaliumarsenits auf die Zymase wiesen *E. Buchner*, *H. Buchner* und *M. Hahn* in ihrer Monographie „Die Zymasegärung" hin (13). Diese Autoren nehmen an, daß Zucker der Veränderung des Kolloidalzustandes der Zymase unter der Wirkung des Arsenits entgegenwirkt.

Nachdem wir bemerkt hatten, daß die lähmenden Mn-Konzentrationen in Hefemazerationssaft die Fällung eines Niederschlags hervorrufen, stellten wir eine Reihe von Versuchen an, um die Wirkung verschiedener Zuckerkonzentrationen auf die Bildung dieses Niederschlags aufzuklären. Es wurden drei Reagenzgläschen genommen, welche je 5 ccm Hefesaft enthielten; in das erste Reagenzgläschen (B) fügte man 2,5 g Saccharose, in das zweite (C) 6 g hinzu, das dritte (A) blieb für die Kontrolle (ohne Saccharose). Dann wurde in alle Reagenzgläschen zu 0,1 Proz. Mn (als $MnSO_4$) hinzugefügt. Dabei wurde folgendes festgestellt: Im Reagenzgläschen A bildete sich ein reichlicher, dicker Niederschlag (welcher dem Umfang nach ein Drittel des Volumens der Flüssigkeit betrug), im Reagenzgläschen B bildete sich auch ein Niederschlag, aber weniger dick und reichlich (ein Fünftel der ganzen Flüssigkeit), im Reagenzgläschen C rief die Hinzufügung von Mn die Bildung unbedeutender einzelner Flocken hervor. Nach Verdünnung mit Wasser gingen die Niederschläge nicht wieder in einen löslichen Zustand über.

Der angegebene Versuch zeigt, daß es bei Anwachsen der Zuckermengen gelingt, die im Hefesaft befindlichen Eiweißsubstanzen vor der Ausflockung bei Zusatz von Mn-Salz zu schützen. Augenscheinlich muß man annehmen, daß der Zucker auch innerhalb der Hefezelle die Eiweißsubstanzen und mit ihnen zugleich auch die Gärungsfermente, welche sich dort befinden, vor der Veränderung ihres physiko-chemischen Zustandes bei Anwesenheit des in die Zelle eingedrungenen Mn-Salzes schützt.

Somit haben unsere Untersuchungen die verschiedene Rolle des Mn in der Alkoholgärung klargelegt. In manchen Fällen erscheint dieses Metall als Aktivator; es stimuliert die Zersetzung des Zuckers durch Gärungsfermente; in anderen Fällen ist seine Wirkung bis zu einer gewissen Konzentration gleich Null, während es in größeren Quantitäten anfängt, die Gärung zu unterdrücken. Die verschiedene physiologische

Bedeutung des Mn sowie anderer katalytischer Elemente war bei Erforschung der Wirkung dieser Substanzen auf das Wachstum und die Entwicklung von Mikroorganismen und höherer Pflanzen und auf das Funktionieren der Enzyme festgestellt (14). Augenscheinlich kann ein und dieselbe Substanz unter verschiedenen Bedingungen der Herkunft und Entwicklung lebendiger Zellen verschiedene Wirkung (stimulierende, inaktive und hemmende) auf die lebendige Zelle oder die von ihr ausgeschiedenen Fermente ausüben. Diese aktive Wirkung in bezug auf eine gewisse Funktion der lebendigen Zelle und ihre Sekrete erscheint nicht als Prärogative eines bestimmten Katalysators; zahlreiche experimentelle Arbeiten weisen darauf hin, daß die verschiedensten Substanzen Katalysatoren bestimmter biochemischer Erscheinungen sein können.

In den klassischen Arbeiten von *Carl Neuberg* und seiner Schule auf dem Gebiet der Alkoholgärung ist die stimulierende Wirkung einer ganzen Reihe der verschiedensten mineralischen und organischen Verbindungen sowie ebenfalls von Tier- und Pflanzen-Extraktivstoffen auf die Zymase festgestellt worden. Die meisten dieser Substanzen sind Akzeptoren für den „Gärungswasserstoff", und mit ihrer Fähigkeit zur „Phytochemischen Reduzierbarkeit" ist nach *Neuberg* (15) ihre aktivierende Wirkung auf die Zuckerzersetzung durch Gärung eng verbunden. Zu gleicher Zeit wurde eine Reihe Substanzen gefunden, welche die Gärung aktivieren, aber der phytochemischen Einwirkung nicht unterworfen sind (16). Interessant ist die Tatsache, daß ein und dieselben Substanzen (z. B. Digitonin und Digitalin) die Gärung mit lebendiger Hefe unterdrücken und andererseits Hefesaftzymase aktivieren (16). Die Verbindungen von Mn, Fe (17) und einiger anderer Elemente zeigen ihrerseits eine aktive Wirkung, positive oder negative, je nach den verschiedensten Bedingungen.

Was ist nun ihre wahre Rolle bei der Alkoholgärung? Fungieren sie als Objekte der „phytochemischen Reduktion" durch den „Gärungswasserstoff" unmittelbar, oder aber, worauf *Neuberg* ebenfalls hinwies, wirken sie in gewissen Fällen als Sensibilisatoren für die Bildung von Substanzen, welche die Gärung aktivieren und sich aus Hefe unter dem Einfluß der strahlenden Energie entwickeln können (18).

Wirken sie auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Gärungsfermente und bei lebendiger Hefe auf die Veränderung physiko-chemischer Prozesse in der Zellengrenzschicht der Hefe? Womit kann man die verschiedene Wirkung dieser Elemente, je nach der verschiedenen Herkunft der Hefe erklären? In welchem Stadium des komplizierten Prozesses der Alkoholgärung tritt die aktive Wirkung des gegebenen katalytischen Elements hervor? Wenn sich die Erforschung des Gärungsproblems weiter entwickelt, wird ohne Zweifel die befriedigende

Lösung aller dieser Fragen gefunden werden; nicht nur derjenigen, welche durch die Sphäre der Gärungsprozesse begrenzt sind, sondern auch derjenigen, die mit den verschiedensten biochemischen Erscheinungen in Zusammenhang stehen.

Literatur.

1) *G. Bertrand*, C. r. de l'Acad. des Sciences **124**; Bull. de la Soc. Chim. 1907. — 2) *G. Bertrand* et *M. Javillier*, Bull. Soc. Chim. **11**, 213, 347, 400, 494 1912; *Olaru*, Bull. Soc. Chim. **17/18**, Nr. 5, S. 130, 1915. — 3) *G. Bertrand*, Vorträge auf dem internationalen Kongreß für angewandte Chemie in Berlin 1903, in Rom 1906, in London 1909 und New York 1912. Revue Scientif 1913; *Th. Bokorny*, diese Zeitschr. **50**, 1913. — 4) *G. Bertrand* et *R. Sazerac*, C. r. **157**, 149, 1913; *E. Kayser* et *H. Marchand*, C. r. **144**, **145**, **151**, **152**; *C. Neuberg* und *C. Reicher*, diese Zeitschr. **4**, 1907; **11**, 1908. — 5) l. c. — 6) *J. March*, „Über die Wirkung der Mangansalze auf die alkoholische Gärung". Berichte d. wiss. Forschungsinstitute in Odessa **1**, 1924, Nr. 10 bis 11 (russisch). — 7) l. c. — 8) *E. Kayser*, C. r. **152**. — 9) Mr. et Mme. *M. Rosenblatt*, Ann. de l'Inst. Past. 1910 et 1914. — 10) *M. Johanessohn*, diese Zeitschr. 1912. — 11) *G. Bertrand*, Mr. et Mme. *M. Rosenblatt*, Ann. de l'Institut Pasteur 1912 et 1913; Bull. Soc. Chim. 1912. — 12) Mr. et Mme. *M. Rosenblatt*, Bull. Soc. Chim. **7**, 861, 1910. — 13) „Die Zymasegärung" 1903, S. 203. — 14) *A. Bach*, Ber. **43**, 1910; *Issaew*, Zeitschr. f. phys. Chem. 1904 bis 1905; *Sarthou*, Journ. de pharm. et Chim. 1907. — 15) *C. Neuberg* und *E. Kerb*, diese Zeitschr. **92**; *C. Neuberg* und *A. Levite*, ebendaselbst **91**; *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, ebendaselbst **67**; *C. Neuberg*, *E. Reinfurth* und *M. Sandberg*, ebendaselbst **120**; *C. Neuberg* und *M. Ringer*, ebendaselbst **90**; *C. Neuberg* und *E. Schwenk*, ebendaselbst **71**; *C. Neuberg* und *E. Welde*, ebendaselbst **62** und **67**. Übersichtsartikel: *Carl Neuberg* und *J. Hirsch*, „Über Fragen der Gärungschemie". Ergebn. d. Physiol. **21**, 1923; *C. Neuberg* und *M. Sandberg*, diese Zeitschr. **109**. — 16) *Carl Neuberg* und *Julius Hirsch*, Ergebn. d. Physiol. **21**, 1923. — 17) *P. Hodel* und *N. Neuenschwander*, diese Zeitschr. **156**, 1925. — 18) *C. Neuberg*, Zuckerumsatz d. pflanzl. Zelle, in Oppenheimers Handb. d. Biochem. **2**, 442, 1924. — 19) *Derselbe*, Monogr. „Beziehungen des Lebens zum Licht". Berlin 1913.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung. XIV.

Von

Bernhard Stuber.

Über den Einfluß der Plasmaeiweißkörper auf die Gerinnungszeit.

Von

Wilhelm Ehrich.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 5. Februar 1926.)

Schon lange hat man sich bemüht, Faktoren zu finden, welche die Blutgerinnungszeit in vitro bedingen; teils durch Aufsuchen von Beziehungen zwischen Gerinnungszeit und Stoffen, die beim Gerinnungsvorgang eine Rolle spielen, teils dadurch, daß man auch den Einfluß anderer Blutbestandteile auf die Gerinnungszeit untersuchte.

Busse (1) fand bei innersekretorischen Störungen keine Beziehungen zwischen Fibrinogen und Blutgerinnungszeit. Nach *Hiruma* (2) bewirkt Pankreasgangunterbindung bei Kaninchen eine Fibrinogensteigerung und eine damit parallel gehende Verzögerung der Blutgerinnung. Bei Cholämie bei Leberinsuffizienz soll die Schwergerinnbarkeit des Blutes auf Mangel an Fibrinogen beruhen [*Nägeli* (3)]. *Pawloff* und *Schazillo* (4) fanden, daß intravenöse Injektionen von Kaninchenschilddrüsenextrakt in physiologischer Kochsalzlösung bei Kaninchen Beschleunigung der Gerinnung und Vermehrung des Fibrinogens und Fibrinferments bewirken. Nach *Roskam* (5) sind Plättchenzahl und Blutgerinnungszeit unabhängig voneinander. *Roskott* (6) findet bei Malaria keine Beziehungen zwischen Thrombocytenzahl und Blutgerinnungszeit. Nach *Semerau-Siemianowski*, *Minkiewicz* und *Puljanowski* (7) läßt sich bei geeigneter Röntgendosis eine Erhöhung der Gerinnungsfähigkeit nachweisen, die parallel mit der Thrombinmenge geht. Thrombokinase beschleunigt die Gerinnung [*Rosin* (8), *Gunzeri* (9)].

Von weiteren Arbeiten, die sich mit Beziehungen zwischen Extrakten aus endokrinen Drüsen und anderen Organen, Eiweißkörpern, Cholesterin, Galle, Zucker, Seifen, Salze, Säuren, Alkalien, *Hofmeister*scher Ionenreihe, Blutgasen einerseits und Blutgerinnungszeit andererseits beschäftigen,

führe ich hier wegen Raumbeschränkung nur an, daß Schilddrüsensekret nach *Rosin* (8) und *Takasaki* (10) die Gerinnung hemmen soll.

Schließlich erwähne ich noch *Czubalski* (11), der durch Scheinfütterung eine Verminderung der Blutgerinnung erreichte. Ferner fanden *Murakami* und *Jamaguchi* (12) bei beschleunigter Senkungsreaktion regelmäßig verlängerte Gerinnungszeit, während *Starlinger* (13) eine Förderung der Agglutination und Senkung der Erythrocyten durch Fibrinogen beschreibt. *Rhodin* (14) sah bei Scharlach eine Parallele zwischen Globulin, Senkungsgeschwindigkeit und Gerinnungszeit.

Wir haben uns hier die Aufgabe gestellt, Beziehungen zwischen Blutgerinnungszeit und den Plasmaeiweißkörpern, dem Albumin, Globulin und Fibrinogen, zu finden.

Diese drei Eiweißkörper sind durch ihr chemisches und physikalisches Verhalten (Löslichkeit, Fällbarkeit, Refraktion und Viskosität) gut charakterisiert [*Hammarsten* (15) u. a.]. Der stabilste Körper ist das Albumin. Es ist ein Gemenge von mindestens zwei Albuminen. Es enthält nach *Fankoni* (16) kein Glykokoll, aber doppelt soviel Schwefel als das Globulin. Albumin ist in Wasser bei neutraler Reaktion löslich, wird durch Zusatz von wenig Säure oder Alkali nicht gefällt, dagegen von größeren Mengen Mineralsäuren und Metallsalzen (*Hammarsten*), z. B. bei Sättigung mit Ammoniumsulfat. Es ist vorhanden in Blutplasma, Serum, Lymphe, Ex- und Transsudaten und wahrscheinlich auch in anderen Geweben.

Das Globulin ist ein Gemenge verschiedener Proteine. *Pick*, *Fuld* und *Spiro* konnten durch Salzfällung zwei verschiedene Globuline darstellen, *Porges* und *Spiro* drei und *Freund* und *Joachim* sogar vier Globuline. *Reiss* (17) teilt in Euglobulin und Pseudoglobulin I und II. Globulin enthält Glykokoll und Phosphor und in geringen Mengen Schwefel. Es ist in der Regel unlöslich in reinem Wasser, dagegen löslich in verdünnten Neutralsalzlösungen. Es wird von NaCl bis zur Sättigung nur unvollständig, vom gleichen Volumen gesättigter NaCl-Lösung im Gegensatz zu Fibrinogen garnicht gefällt (*Hammarsten*). Hingegen wird es von Ammoniumsulfathalbsättigung gefällt. Man findet es im Plasma, Serum, Lymphe, Trans- und Exsudaten, weißen und roten Blutkörperchen und wahrscheinlich in verschiedenen tierischen Geweben. Das aus Blutserum dargestellte Globulin ist stets von Phosphatiden und Thrombin verunreinigt. Durch Dialyse wird es nur teilweise gefällt. Mehrere Globuline gehen äußerst leicht durch Einwirken von sehr wenig Säure, wie auch beim Stehenlassen unter Wasser in ausgefälltem Zustand, in Albuminate über und werden dabei unlöslich in Neutralsalzlösung.

Der labilste Eiweißkörper ist das Fibrinogen. Es fällt beim Gerinnungsvorgang mit aus und hat die Eigenschaften eines Globulins. Nach *Stuber* und *Funk* (18) folgt es genau den Gesetzen, welche *Pauli* und seine Schüler für das Albumin und Globulin aufgestellt haben. Es ist unlöslich in reinem Wasser, löslich in verdünnten Salzlösungen, durch Sättigung mit NaCl. Es findet sich nach *Hammarsten* und *Abderhalden* (19) im Blutplasma, Chylus, Lymphe, einigen Ex- und Transsudaten, im Knochenmark und vielleicht auch in anderen lymphoiden Geweben. Bildungsorte sind wahrscheinlich Leber, Darmwand und hämopoetischer Apparat [*Rosin* (8)]. Nach *Hammarsten* verhalten sich die Fibrinogene verschiedener Tierarten etwas verschieden.

Blutentnahme und Serumgewinnung.

Wir entnahmen das Blut mit *Reiss* (17) u. a. morgens nüchtern. In der Literatur werden deutliche Tagesschwankungen des Eiweißspiegels, der Einfluß von Flüssigkeitszufuhr, Eiweißmast, spezifischer Tätigkeit der Organe und anderes beschrieben.

Da nun *Petschacher* (20) bei der Verdauungslipämie eine Steigerung der Viskosität und des Gesamteiweißes fand, stellten wir einige Versuche hierüber an. Wir untersuchten Blut vor und nach Eingabe von 125 g Butter und fanden die gleichen Ergebnisse wie *Petschacher* (s. Tabelle I).

Tabelle I.

Fälle	Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz	Albumin-Globulin-verhältnis	η	
1. Dr. *E.*, 26. V., normal	7,90	4,80	3,1	61 : 39	1,740	Methode: *Reiss-Rohrer*
1½ Stdn. } nach 125 g Butter	7,90	5,20	2,7	66 : 34	1,710	
2½ „ } nach 125 g Butter	8,30	5,30	3,0	64 : 36	1,765	
2. Dr. *D.*, 28. V., normal	7,85	4,95	2,9	63 : 37	1,720	
1 Std. } nach 125 g Butter	8,50	5,40	3,1	63 : 37	1,796	
3 Stdn. } nach 125 g Butter	8,40	5,20	3,2	62 : 38	1,793	
4¼ „ } nach 125 g Butter	8,70	5,50	3,2	63 : 37	1,820	
3. Dr. *D.*, 8. VII., normal	8,00	4,30	3,7	54 : 46	1,780	
1 Std. später lipäm.	8,20	4,60	3,6	56 : 44	1,798	

Vor der Blutentnahme ließen wir die Kranken nach *Nägeli* (3) 20 Minuten ruhen.

Einige Autoren berichten über den Einfluß von Muskelarbeit und Ermüdung auf Bluteiweiß und Gerinnungszeit. Tabelle II zeigt Schwankungen bei Blutentnahmen an verschiedenen Tagen, bei verschiedenen Tageszeiten und ohne vorherige Ruhe bei sonst gleichen Bedingungen.

Tabelle II.

Fälle	Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	η	
1. Dr. *E.*, 6. IV., 20 ccm	8,4	5,0	3,4	60 : 40	1,798	Methode: *Reiss-Rohrer*
14. V., 20 „	7,8	4,4	3,4	56 : 44	1,745	
14. V., 20 „	7,7	4,1	3,6	53 : 47	1,748	
18. V., 50 „	7,9	5,1	2,8	65 : 35	1,710	
26. V., 20 „	7,9	4,8	3,1	61 : 39	1,740	
1. VII., 20 „	7,9	4,7	3,2	60 : 40	1,740	
7. VII., 50 „	8,6	5,3	3,3	62 : 38	1,815	
2. Dr. *D.*, 15. V., 50 „	8,0	5,1	2,9	64 : 36	1,735	
20. V., 50 „	7,7	5,2	2,5	68 : 32	1,675	
27. V., 15 „	8,2	5,3	2,9	65 : 35	1,750	
28. V., 25 „	7,9	5,0	2,9	63 : 37	1,720	
8. VII., 50 „	8,0	5,0	3,0	63 : 37	1,730	

Wir achteten ferner darauf, daß die Kranken vor der Blutentnahme nicht gedurstet oder geschwitzt hatten und daß kein Aderlaß vorausging, da dadurch die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Blutes geändert werden sollen. Auch wurden therapeutische Einflüsse vermieden, wie sie nach Medikamenten und Bestrahlungen beschrieben werden.

Bei Eiweißinjektionen fanden *Berger* (21) u. a. nach einem Latenzstadium eine initiale Verminderung und dann Vermehrung des Gesamteiweißes, ferner nach einem Latenzstadium initiale Verminderung des Globulins, dann Vermehrung mit nachfolgenden subnormalen Werten. *Löhr* (22) und *Antonio* (23) beschreiben Zunahme der Serumviskosität, *Löhr, Frisch* und *Starlinger* eine Steigerung des Fibrinogens, *Binet* (24) fand bei Serotherapie eine Phase erhöhter Gerinnbarkeit, die 24 bis 48 Stunden anhielt. Thyreoidin soll eine Globulinvermehrung hervorrufen [*Deusch* (25) u. a.]. Nach *Abelin* und *Sato* (26) führen Schilddrüsentabletten bei Kaninchen und Hammel nach anfänglichem Anstieg zu Abnahme der Viskosität und des Gesamteiweißes. Thyreoglandol soll bei malignen Tumoren der Schilddrüse, die eine Globulinvermehrung zeigten, eine Fibrinogen- und Globulinverminderung und Zunahme der Albuminfraktion bewirken [*Starlinger* (27)]. *Roskam* (28) gelang es, durch intravenöse Injektionen von Gelatinelösung das Blut von Hunden globulinarm zu machen, wobei sich nach *Rosin* (8) die Gerinnungszeit verkürzt. Ferner beschreiben eine große Anzahl von Autoren den durch therapeutische Maßnahmen bedingten Einfluß von Immunisierung, Eiweißstoffen, Diuretika, Herzmittel, Morphium, Salvarsan, Jod, Adrenalin, Bestrahlungen, Bäder u. a. auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Blutes.

Wir entnahmen das Blut aus der Vena cubitalis, um Blut ohne Beimengungen von Gewebssaft zu bekommen. Gewebssaft beschleunigt die Gerinnung außerordentlich. Bekamen wir beim Ansaugen der Spritze nicht gleich nach dem ersten Einstich Blut, so wurde die Venae punctio mit frischer Nadel wiederholt. Bei Tieren gewannen wir das Blut aus den Karotiden mit paraffinierter Kanüle.

Blut aus ungestauter Vene einerseits und Arterien- und Kapillarblut andererseits verhalten sich nach mehreren Autoren verschieden. Hingegen sollen keine Unterschiede zwischen Venenblut und arterialisiertem Kapillarblut bestehen.

Wir entnahmen das Blut ohne die übliche Stauung.

Stauung erhöht den Eiweißwert (*Reiss* u. a.), in gleichem Maße die Viskosität (*Alder*) und beschleunigt die Gerinnung [*Heubner-Rona* (29) u. a.]. Kurzes Anstauen soll nach *Frisch* (30) keine Fehler bedingen. Da auch wir durch kurzes Anstauen (Anstauen, bis die Vene gut sichtbar ist, einstechen, Staubinde entfernen und etwas warten) keine Abweichung von ungestautem Blut finden konnten, entnahmen wir bei den in Tabelle IX angeführten Kranken das Blut nach kurzem Anstauen, weil sie zum Teil recht kleine und dünne Venen hatten.

Es wurde zu allen Versuchen und Bestimmungen immer nur Blut aus ein und derselben Punktion verwandt.

Hueck (31) fand in keiner Blutprobe mit der nächsten einen gleichen Eiweißwert, fand in Reihen verschiedener Proben hintereinander langsames Ansteigen der Konzentration.

Ferner wurde darauf geachtet, daß die Spritze sauber und trocken und die Kanüle glatt war, damit keine mechanische Gerinnungsbeschleunigung eintrat. Die Spritze und Glasgefäße wurden möglichst ruhig gehalten und nur Blut verwandt, das leicht aus der Spritze ging. Spritze und Gläser wurden vor Gebrauch nicht mit wollenem Lappen abgerieben, da hierdurch eine Störung des isoelektrischen Gleichgewichts und damit Gerinnungsbeschleunigung auftrat (*Stuber*). Glasgefäße und Pipetten wurden paraffiniert, um mechanische Gerinnungsbeschleunigung und Hämolyse zu vermeiden.

Frisch (30) u. a. betonen, daß Blut zu exakten Untersuchungen nicht hämolytisch sein darf. *Meier* (32) fand bei hämolytischem Serum, das er durch Gefrieren und Wiederauftauen des Blutes gewonnen hatte, Erhöhung der Viskosität.

Wir stellten Untersuchungen über die Hämolyse an. Das Blut wurde durch Gefrieren und Wiederauftauen hämolytisch gemacht, nachdem wir im Gegensatz zu *Botazzi* festgestellt hatten, daß die Konzentration des Serums durch das Gefrieren allein nicht geändert wird (s. Tabelle III).

Tabelle III.

Fälle	Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	η	
1. Dr. *E.*, 14. V.,						
1. Normales Serum . .	7,8	4,4	3,4	56 : 44	1,745	Methode: *Reiss-Rohrer*
Gefrorenes „ . .	7,8	4,4	3,4	56 : 44	1,750	
2. Dr. *E.*, 14. V.,						
2. Normales Serum . .	7,65	4,1	3,6	53 : 47	1,748	
Gefrorenes „ . .	7,6	4,0	3,6	52 : 48	1,750	
3. Dr. *D.*, 15. V.,						
Normales Serum . .	8,0	5,1	2,9	64 : 36	1,735	
Gefrorenes „ . .	8,0	5,0	3,0	63 : 37	1,745	

Wir untersuchten nicht nur das hämolytische Serum und das aus gleicher Probe gewonnene normale Serum, sondern stellten auch verschiedene Mischungen der beiden her. Nr. 6 (Tabelle IV) war Zufallsbefund bei Untersuchungen an zwei Blutproben, die wir bei ein und derselben Venae punctio entnommen und dann auf zwei Gefäße verteilt hatten, wobei die eine Probe hämolytisch wurde. Wir fanden bei Hämolyse eine Erhöhung des Gesamteiweißes, des Albumins und der Viskosität, Verminderung des Globulins, starke Verschiebung des Albumin-Globulinverhältnisses zugunsten des Albumins und Beschleunigung der Gerinnung (s. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Fälle	Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	η
1. Hund, 2. V.: Normalserum . .	9,1	4,0	5,1	44 : 56	2,050
1,0 Normals. : 0,1 hämolyt. Ser.	9,35	4,9	4,45	52 : 48	2,020
1,0 „ : 0,2 „ „	10,0	6,0–7,0	4,0–3,0	60– 70 : 40–30	2,060
1,0 „ : 0,4 „ „	10,8	7,6–8,6	3,2–2,2	70– 80 : 30–20	2,110
Hämolyt. Serum	15,4	13,9–15,4	1,5–0	90–100 : 10–0	2,825
2. Hund, 8. V.: Normalserum . .	7,3	2,5	4,8	34 : 66	1,805
1,0 Normals. : 1 hämolyt. Ser.	8,0	3,4	4,6	43 : 57	1,850
Hämolyt. Serum	8,7	4,35	4,35	50 : 50	1,905
3. Dr. *E.*, 14. V.: Normalserum .	7,7	4,1	3,6	53 : 47	1,748
1,0 Normals. : 1 hämolyt. Ser.	9,4	6,9	2,5	73 : 27	1,850
Hämolyt. Serum	10,8	9,7	1,1	90 : 10	1,965
4. Dr. *E.*, 18. V.: Normalserum .	7,9	5,1	2,8	65 : 35	1,710
1,0 Normalserum : 0,125 hämolyt. Serum	8,5	5,8	2,7	68 : 32	1,765
1,0 Normalserum : 0,25 hämolyt. Serum	9,1	6,1	3,0	67 : 33	1,825
1,0 Normals. : 0,5 hämolyt. Ser.	9,8	7,0	2,8	71 : 29	1,900
1,0 „ : 1,0 „ „	10,6	8,5	2,1	80 : 20	1,965
Hämolyt. Serum	13,4	10,7–13,4	2,7–0	80–100 : 20–0	2,295
5. Dr. *D.*, 20. V: Normalserum .	7,7	5,2	2,5	68 : 32	1,675
1,0 Normalserum : 0,05 hämolyt. Serum	8,1	5,6	2,5	69 : 31	1,710
1,0 Normals. : 0,1 hämolyt. Ser.	8,6	6,2	2,4	72 : 28	1,750
1,0 „ : 0,5 „ „	10,4	8,3– 8,8	2,1–1,6	80– 85 : 20–15	1,940
Hämolyt. Serum	15,2	14,4–15,2	0,8–0	95–100 : 5–0	2,650
6. Frl. *Schellhammer*, 15. VII.: Normalserum	9,8	5,9	3,9	60 : 70	2,080
Hämolyt. Serum	12,8	∧	∨	—	2,525

Methode *Reiss-Rohrer*

Das Blut wurde ferner vor Staubfäden und anderen Verunreinigungen geschützt.

In der Literatur wird Gerinnungsbeschleunigung durch Staubfäden, Änderung der Brechung durch Salzkristalle u. a. beschrieben.

Größere Temperaturschwankungen wurden vermieden, da Kälte die Gerinnung verlangsamt und Wärme beschleunigt.

Das so gewonnene Blut wurde etwa 1 Stunde stehen gelassen, abgestochen, das Serum nach $1\frac{1}{2}$ weiteren Stunden abgegossen und 10 Minuten zentrifugiert [*Reiss* (17)]. Zurückbleibende Spuren von Blut sollen Viskosität und Brechung nicht beeinflussen [*Nägeli* (3)]. Wir legten Wert darauf, genau 10 Minuten zu zentrifugieren, da *Abderhalden* bei wiederholtem Zentrifugieren und *Hueck* (31) beim spontanen Auspressen in den verschiedenen Schichten der Blutkörperchensäule und des Serums ein verschiedenes Verhalten fanden.

Wir gebrauchten somit Vollblutserum.

Der Streit, ob sich Plasma- und Vollblutserum verschieden verhalten, ist vor kurzem durch *Hueck* (31) in verneinendem Sinne entschieden.

Wir schützten Blut und Serum nach *Berger* (21) u. a. möglichst vor Verdunstung.

Wir stellten Versuche über die Verdunstung an und fanden in einigen Versuchsreihen, die wir im Freien und im Eisschrank bei verschiedenen Temperaturen verkorkt oder offen aufbewahrten, Erhöhung des Gesamteiweißes, der Viskosität und des Globulins, Erniedrigung des Albumins und somit eine deutliche Verschiebung des Albumin-Globulinverhältnisses zugunsten des Globulins (s. Tabelle V). Bei längerem Aufbewahren von 48 Stunden fanden wir eine Verschiebung zugunsten des Albumins.

Zur Verhütung der Verdunstung bedeckten wir die Glasgefäße im allgemeinen mit Stanniol, da wir fanden, daß dieses bei festem Aufdrücken vollkommen vor Verdunstung schützt. Nur bei den Versuchen in Tabelle VI überschichteten wir mit Paraff. liquidum.

Blut und Serum wurden immer möglichst bald untersucht, da Stehenlassen auch unter Luftabschluß die Werte ändert.

Hueck (31) fand bei luftdichtem Stehenlassen des Serums (schon vom Morgen bis zum Abend) Vermehrung des Gesamteiweißes bis 0,3 Proz. und Viskositätserhöhung. Wenn es auf dem Blutkuchen stehen blieb, Veränderungen bis 0,7 Proz. Nach Überschichten mit Paraff. liquid. wurden die Differenzen geringer, aber oft noch nachweisbar. Wir dagegen fanden bei Stehenlassen unter Luftabschluß in verschiedenen Versuchsreihen im Freien und im Eisschrank bei verschiedenen Temperaturen regelmäßig eine Erhöhung des Gesamteiweißes und des Albumins, eine Erniedrigung der Viskosität und des Globulins und somit eine Verschiebung zugunsten des Albumins (s. Tabelle VI). Nach Fertigstellung unserer Arbeit erschienen zwei Arbeiten von *Petschacher* (33, 34), in denen er darauf hinweist, daß das Serum sich nur bei bakteriellem Einfluß in seinem physikalischen Verhalten ändert. Bei sterilem Arbeiten fand er bei luftdichtem Stehenlassen erst nach längerer Zeit eine Steigerung der Viskosität und der Ammoniumsulfatfällbarkeit, während der Eiweißgehalt sich nicht änderte.

Vor jeder Untersuchung wurde schließlich das Serum vorsichtig umgeschüttelt, da es sich beim Stehen in Schichten mit verschiedener Konzentration sondert [*Hueck* (31)].

Bestimmung der Blutgerinnungszeit.

Um die Blutgerinnungszeit in vitro zu bestimmen, bedienten wir uns der Methode *Heubner-Rona* (29).

Spencker (35) stellt für eine brauchbare Methode folgende Forderungen auf:

1. Man darf nur Venenblut verwenden. Denn bei Blut, das durch Hautstich gewonnen wird, ist immer Gewebssaft beigemengt, der die Werte verkürzt.

2. Die verwendete Blutmenge muß immer gleich groß sein, da eine größere Menge Blut eine längere Gerinnungszeit aufweist.

Tabelle V.

Fälle	Gesamt-Eiweiß, g-Proz.			η			Albumin, g-Proz.			Globulin, g-Proz.			Albumin-Globulinverhältnis		
	I *)	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1. Hund, 30. III.	7,0	7,0		1,593	1,643		4,9	4,1		2,1	2,9		70 : 30	59 : 41	
2. Hund, 1. IV.	7,4	7,4		1,704	1,758		4,1	3,4		3,3	4,0		55 : 45	46 : 54	
Desgl. nach Aderlaß	6,8	7,0		1,619	1,660		4,1	3,8		2,7	3,2		60 : 40	54 : 46	
3. Kaninchen, 30. IV.	8,0	8,0		1,798	1,850		4,2	3,4		3,8	4,6		52 : 48	43 : 57	
Desgl. hämolytisch	8,0	8,0		1,795	1,830		4,2	3,6		3,8	4,4		52 : 48	45 : 55	
4. Dr. *E.*, 26. V.	7,9	8,4		1,740	1,825		4,8	4,8		3,1	3,6		61 : 39	57 : 43	
Desgl. lipämisch	7,9	8,3		1,710	1,805		5,2	4,8		2,7	3,5		66 : 34	58 : 42	
5. Dr. *D.*, 27. V.	8,5	9,0		1,805	1,878		5,4	5,8		3,1	3,2		63 : 37	65 : 35	
6. Frl. *L.*, 6. VII. im Freien	8,0		8,5	1,800		1,830	4,2		4,9	3,8		3,6	53 : 47		58 : 42
Desgl. im Eisschrank	8,0		8,2	1,800		1,810	4,2		4,4	3,8		3,8	53 : 47		54 : 46
7. Frl. *G.*, 10. VII.	8,5		9,1	1,895		1,970	4,1		4,5	4,4		4,5	48 : 52		50 : 50
Desgl. mit Globulinzusatz	9,0		9,9	1,990		2,100	4,1		—	4,9		—	45 : 55		—
8. *Schellhammer*, 15. VII.	6,7		9,5	1,630		1,982	3,7		5,4	3,0		4,1	55 : 45		57 : 43
9. Dr. *E.*, 31. VII., mit NaCl-Lösung	6,7	7,9		1,620	1,830		3,8	3,6		2,9	4,3		57 : 43	45 : 55	
Desgl. mit Fibrinogenzusatz	6,5	7,6		1,600	1,850		3,7	2,4		2,8	5,2		57 : 43	32 : 68	

Tabelle VI.

Fälle	Gesamt-Eiweiß, g-Proz.			η			Albumin, g-Proz.			Globulin, g-Proz.			Albumin-Globulinverhältnis		
	I *)	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1. Kaninchen, 30. IV.	7,4	7,5		1,735	1,725		3,6	4,0		3,8	3,5		49 : 51	53 : 47	
2. Kaninchen, 25. V.	6,0	6,2		1,500	1,500		4,1	4,5		1,9	1,7		69 : 31	73 : 27	
Desgl. nach Aderlaß	5,0	5,0		1,415	1,400		3,3	3,6		1,7	1,4		66 : 34	73 : 27	
3. Frl. *L.*, 6. VII. im Freien	8,0		8,1	1,800		1,788	4,2		4,5	3,8		3,6	53 : 47		55 : 45
Desgl. im Eischrank	8,0		8,2	1,800		1,790	4,2		4,7	3,8		3,5	53 : 47		57 : 43
4. Frl. *G.*, 10. VII.	8,9		8,9	1,950		1,940	4,3		4,5	4,6		4,4	48 : 52		51 : 49
Desgl. mit Globulinzusatz	8,7		8,7	2,020		2,015	3,1		3,1	5,6		5,6	36 : 64		36 : 64

*) I = sofort, II = nach 16 bis 24 Stunden, III = nach 48 Stunden untersucht.

3. Die Oberfläche des Blutes muß möglichst klein und immer gleich groß sein, da die Oberfläche die Gerinnungszeit beeinflußt. Kapillaren sind zu verwerfen, weil ihre Innenfläche unübersehbaren Bedingungen unterworfen ist.

4. Die Gerinnungszeit muß bei konstanter Temperatur gemessen werden, da Kälte die Gerinnung verlangsamt und Wärme sie beschleunigt.

5. Das Blut muß möglichst wenig bewegt werden, da Bewegung gerinnungsbeschleunigend wirkt.

6. Der Gerinnungsvorgang muß in einem abgeschlossenen Gefäß vor sich gehen, welches das Blut vor Verunreinigungen und Austrocknen schützt.

7. Die Methode muß einen scharfen Endpunkt haben.

Die Methode *Heubner-Rona* erfüllt die Forderungen *Spenckers*. Sie ist eine Tropfmethode, bei welcher der Augenblick des letzten Tropfenfalls den Endpunkt der Gerinnungszeit scharf markiert.

Von dem auf oben beschriebene Weise gewonnenen Blute wurden möglichst schnell nach der Entnahme 5 ccm mit der Tropfpipette aufgesogen, diese mit Einsatzgefäß und Aufsatzkapillare versehen und das Ganze senkrecht in ein Wasserbad von 38° C mit durchsichtigen Wänden gesetzt. Dann wurde der Hahn so geöffnet, daß das Blut in regelmäßigen Intervallen von 7 bis 8 Sekunden tropfte. Bei länger dauernder Gerinnung wurde der Hahn auch vorübergehend wieder geschlossen. Als Gerinnungszeit wurde die Zeit vermerkt, welche von der Mitte des Beginns und des Endes des Übertritts des Blutes in die Spritze bis zum Augenblick des letzten Tropfenfalls verstrich.

Vom Vorwärmen der Spritzen, Bechergläser und Apparate wurde mit *Heubner-Rona* (29) abgesehen.

Als normale Gerinnungszeit fanden wir auf diese Weise im Mittel 7¼ Minuten [*Heubner-Rona* (29) im Mittel 5 Minuten, *Spencker* (35) 9½ bis 10½ Minuten].

Ob das Alter Einfluß auf die Gerinnungszeit hat, ist umstritten. Auch scheinen Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren zu bestehen.

Bestimmung der Serumeiweißkörper und der Viskosität des Serums.

Auch hier gibt es eine Reihe von Methoden. *Starlinger* und *Hartl* (36) haben kürzlich ihre wichtigsten (die gravimetrischen, kjeldahlometrischen und auf optischen Eigenschaften beruhenden) einer eingehenden Prüfung unterzogen. Wir entschlossen uns aus weiter unten angeführten Gründen zu den Methoden von *Robertson* und *Reiss-Rohrer*.

Die *Robertson*-Methode beruht auf Feststellung der Brechung des Serums, desselben nach Ammoniumsulfathalbfällung und der Restrefraktion, und auf Errechnung der Eiweißwerte aus diesen Brechungswerten.

Die technischen Fehler beim Ablesen der Brechungswerte betragen nach *Reiss*, *Starlinger* und *Hartl* 0,05 Skalenteile = 0,01 g-Proz. Eiweiß, nach *Berger* und *Petschacher* (37) 0,1 Skalenteile, sind also zu vernachlässigen.

Auch Bedenken, daß bei Essigsäurekochfällung Nichteiweißkörper mitgerissen werden, oder die Ausfällung der Eiweißkörper nur unvollständig erfolgt, oder daß bei der Ammoniumsulfatfällung Albumine mitgerissen werden und daß das Präzipitatvolumen und etwaige Unterschiede in der Salzverteilung zwischen Niederschlag und Lösung keine Berücksichtigung fänden, sind widerlegt worden (*Starlinger* und *Hartl* u. a.).

Anders verhält es sich aber mit den grundsätzlichen Annahmen der Methode. Die erste, daß die Gesamtrefraktion gleich der Summe der Teilrefraktionen ist (*Robertson*, *Reiss*, *Berger* und *Petschacher*) wird von *Starlinger* und *Hartl* bestätigt. Die zweite Annahme aber, daß Gesamteiweiß und die einzelnen Eiweißgruppen eine einheitliche konstante spezifische Refraktion besitzen, wird von ihnen abgelehnt [desgleichen von *Berger* und *Petschacher* (37)].

Die Größe der Gesamteiweißkonzentration hatte nach *Starlinger* und *Hartl* bei 77 Seren eine Ausschlagsbreite von 0,004 39 = $^1/_{10}$ des Mittelwertes, die Größe der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes bei 69 Seren eine solche von 0,000 79 = $^2/_5$ des Mittelwertes. Die Ausschlagsbreite der spezifischen Refraktion der Ammoniumganzfällung betrug in isolierten Lösungen bei sechs Seren 0,000 67 = $^2/_5$ des Mittelwertes, in Lösungsgemischen (in Anwesenheit von Ammoniumsulfat) bei 23 Seren 0,001 83 = fast die Größe des Mittelwertes, der Ammoniumhalbfällung in isolierten Lösungen bei sieben Seren 0,000 98 = $^2/_5$, in Lösungsgemischen 0,002 67 = größer als der Mittelwert. Hingegen waren die Abweichungen der Bestimmung zu vernachlässigen.

Auch der Vergleich zwischen *Robertson* und maßanalytischen Werten war unbefriedigend. *Starlinger* und *Hartl* fanden bei 66 Seren in drei Fällen keine Differenzen, 19mal *Robertson* größer und viermal die gravimetrischen Werte höher. Desgleichen bei Vergleich der einzelnen Eiweißfraktionen: und zwar bei Ammoniumsulfathalbfällung bei 25 Seren einmal diese gleich dem gravimetrischen Wert, 14mal die gravimetrischen Werte höher und zehnmal niedriger, und bei Ammoniumsulfatganzfällung einmal keine Differenzen, zehnmal die *Robertson*-Werte niedriger und 14mal höher.

Die Kritik *Starlinger* und *Hartls* lautet also recht ungünstig.

Die zweite von uns verwendete Methode, die kombinierte Viskosirefraktometrie von *Reiss-Rohrer*, beruht auf der Bestimmung des Gesamteiweißes mittels des *Pulfrich*schen Instruments und der *Reiss*schen Tabelle und der einzelnen Eiweißkörper mittels Feststellung der Viskosität mit dem Apparat von *Hess* und der *Rohrer*schen Tabelle.

Die erste Voraussetzung *der Gesamteiweißbestimmung* nach *Reiss*, daß die Gesamtrefraktion gleich der Summe der Teilrefraktionen ist, wurde oben bestätigt. Die zweite, daß das Gesamteiweiß eine einheitliche konstante spezifische Refraktion besitzt, wurde oben als unrichtig bezeichnet. Die dritte schließlich, daß die Refraktion, d. h. die Brechung der Nichteiweißkörper als konstant anzusehen ist, wurde von *Starlinger* und *Hartl* ebenfalls als unrichtig erkannt.

Sie fanden bei 77 Seren eine Ausschlagbreite der Restrefraktion von 0,00168 = ¾ des Mittelwertes, während die mittleren Abweichung ihrer Bestimmung zu vernachlässigen war. Ganz ungenau soll sie bei Urämie, Ikterus, Coma diabeticum, Lipämie u. a. sein [*Hueck* (31) u. a.].

Im Vergleich von *Reiss* und maßanalytischen Werten fanden sie bei 79 Seren Unterschiede von 0,1 bis 2,5 Proz. Gesamteiweiß, zwischen *Reiss* und *Robertson* bei 28 Seren die *Reiss*-Werte größer als die *Robertson*-Werte.

Die erste Voraussetzung der *Bestimmung der einzelnen Eiweißkörper nach Rohrer*, daß die beiden Eiweißgruppen eine konstante, einheitliche, untereinander verschiedene Viskosität besitzen, ist unbewiesen. Die spezifische Viskosität scheint zu schwanken [*Berger* und *Petschacher* (37) u. a.]. Nach *Starlinger* und *Hartl* sagt die Viskosität eines isolierten Eiweißkörpers nichts über die Viskosität eines nativen Serums aus.

Die zweite Voraussetzung, daß der auf die Nichteiweißkörper entfallende Anteil der Gesamtviskosität konstant ist, scheint richtig zu sein (*Starlinger* und *Hartl* u. a.).

Die dritte schließlich, daß die Viskosität der Eiweißkörper keiner Beeinflussung durch die Nichteiweißkörper unterliegt, muß als unwahrscheinlich angesehen werden (*Starlinger* und *Hartl* u. a.).

Starlinger und *Hartl* fanden bei 25 Seren im Vergleich zwischen Gravimetrie und *Rohrer*-Methode 18mal Globulin-*Rohrer* kleiner, sechsmal größer als die gravimetrisch ermittelten Werte und einmal keine Differenz. Im Vergleich zwischen *Rohrer*- und *Robertson*-Methode fanden sie bei 27 Seren zehnmal Globulin-*Rohrer* größer und 17mal kleiner als die *Robertson*-Werte.

Starlinger und *Hartl* lehnen somit die kombinierte Viskosirefraktometrie von *Reiss-Rohrer* vollkommen ab. Die Methoden arbeiten also mit erheblichen Fehlerquellen. Für unsere Fragestellung fielen dieselben weniger ins Gewicht, da es sich für uns nur um Vergleichswerte handelte.

Die *Reiss-Rohrer*-Methode verwandten wir nur bei Untersuchung von Veränderungen ein und desselben Blutes oder Serums oder als Vergleichsmethode oder bei Erwartung größerer Ausschläge und zu orientierenden Zwecken.

Die *Robertson*-Methode hingegen gebrauchten wir auch zu Vergleichsbestimmungen an verschiedenen Seren. Unsere Resultate in Tabelle IX sprechen dafür, daß sie mindestens in den Globulinwerten bei Umrechnung in Grammprozente für unsere Untersuchung ausreichend war.

Schon *Starlinger* und *Hartl* (36) geben zu, daß die *Robertson*-Methode zu orientierenden Zwecken oder bei Erwartung größerer Ausschläge bei Umrechnung in Grammprozente eventuell brauchbar sei. *Rohrer* (38) hält seine Methode bei normalen Seren für brauchbar, desgleichen *Wanner* (39). Nach *Schindera* (40) liefert *Robertson* relativ genaue Werte. Nach *v. Frey* (41) mag die *Rohrer*-Methode an ein und demselben Serum geeignet sein, desgleichen nach *Neuschloss* und *Trelles* (42). *Hueck* (31) findet im allgemeinen Bestätigung der *Reiss*schen Werte bei normalen Seren, während er die Albumin-Globulinbestimmung mit größter Vorsicht auffaßt. Nach *Petschacher* (20) ist *Robertson* hinreichend genau. Nach *Berger*

und *Petschacher* geben beide Methoden dem Sinne nach richtige Werte, und zwar *Robertson* besser als *Rohrer*. Die reinen Refraktionswerte und Werte der Viskosität hingegen werden nirgends geschmälert.

Methodische Ausführung der Reiss-Rohrer-Methode.

Zunächst wurde das Serum umgeschüttelt und ein großer Tropfen desselben in das *Pulfrich*sche Eintauchrefraktometer gebracht und dieses in ein Wasserbad von 17,5° C getan.

Schwankungen der Temperatur von 0,5° bedingen nach *Kupelwieser* (43) u. a. Schwankungen von 0,04 Skalenteilen, sind zu vernachlässigen.

Es wurde immer auf möglichst gleiche Spiegelstellung geachtet, da diese von Einfluß sein soll. 10 bis 15 Minuten nach Einstellung wurden die Skalenteile abgelesen. Bei Doppelbestimmungen erhielten wir so stets übereinstimmende Werte. Die so gefundenen Werte wurden dann mittels der *Reiss*schen Tabelle in Eiweißprozente umgerechnet und diese auf eine Stelle nach dem Komma abgerundet. Von Zeit zu Zeit wurde das Refraktometer mit Aqua dest. justiert.

Das gleiche Serum wurde zu gleicher Zeit mit dem *Hess*schen Viskosimeter untersucht. Mit dem in die absolut sauberen und trockenen Ersatzröhrchen aufgesogenen Serum wurde zunächst der Apparat vorgespült. Dann wurden mit frischen Ersatzröhrchen mindestens zwei Messungsserien von mindestens fünf Messungen ausgeführt, die verworfen wurden, wenn Differenzen von über 0,01 Skalenteilen auftraten. Es wurde darauf geachtet, daß keinerlei Störungen auftraten, wie Luftbläschen, ungenügendes Auswaschen des Ammoniaks, körperliche Teilchen, Flüssigkeit im Verbindungsrohr, verschiedene Länge der Flüssigkeitssäule. Die Messungen wurden bei Temperaturen von 17 bis 23° ausgeführt.

Schwierig war die exakte Ablesung der zweiten Dezimale, besonders deswegen, weil ja vier Ablesungen bei jeder Bestimmung nötig sind [*Hueck* (31)]. Man muß darauf achten, daß man das Auge, mit dem man abliest, immer genau senkrecht über den betreffenden Teilstrich hält. Schwierig ist auch das Ansaugen, das möglichst immer unter gleichem Druck erfolgen muß.

Die so gefundenen Werte wurden dann mittels der *Rohrer*schen Kurven in das Albumin-Globulinverhältnis umgerechnet und hieraus und aus dem nach *Reiss* bestimmten Gesamteiweiß Albumin und Globulin in Grammprozenten errechnet.

Von Zeit zu Zeit wurde der *Hess*sche Apparat mit Aqua dest. auf seinen Nullpunkt geprüft.

Methodische Ausführung der Robertson-Methode.

Zu gleicher Zeit wurde gleiches Serum und n/25 Essigsäure zu gleichen Teilen zusammengetan und über der Flamme unter Luftabschluß aufgekocht.

Bei allen Abmessungen mit Pipetten wurde auf peinlichste Sauberkeit geachtet. Den Pipetten darf kein Fett anhaften, da sonst Flüssigkeit an ihr haften bleibt und dadurch die Abmessung vollkommen ungenau wird. Nach gründlicher Säuberung unter der Wasserstrahlpumpe wurden sie mit Aqua dest. durchgespült und gründlich getrocknet. Reinigung mit Alkohol und Äther ist zu verwerfen, da leicht Äther zurückbleibt. Man darf auch stets nur ein und dieselbe Pipette bei solchen Abmessungen benutzen und muß stets genau ablesen. Auch sind beim Abmessen der hoch lichtbrechenden Flüssigkeitsmengen Temperaturdifferenzen zu vermeiden (*Berger* und *Petschacher*).

Nach Ausfällung der Eiweißkörper wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen, 10 Minuten zentrifugiert und die Restrefraktion bestimmt. Größere einzelne Fällungsteilchen sollen die Brechung nicht beeinflussen.

Ferner wurden gleiche Teile kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung und Serum zusammengetan und unter Stanniolverschluß mindestens 1 Stunde stehengelassen. Nach 20 Minuten Zentrifugierens wurde die überstehende Flüssigkeit abgehebert, mit gleicher Menge Aqua dest. versetzt und die Brechung bestimmt. Es wurden stets Doppelbestimmungen ausgeführt und Schwankungen von mehr als 0,5 Skalenteilen verworfen. Gleichzeitig wurde immer die Brechung der Vergleichsflüssigkeiten bestimmt.

Die so gefundenen Werte wurden dann nach *Berger* und *Petschacher* (37) in Gesamteiweiß, Albumin, Globulin und das Albumin-Globulinverhältnis umgerechnet. Zum Schluß errechneten wir die „spezifische Viskositätserhöhung" nach *Petschacher*, eine Zahl, die die Viskosität von 1 g-Proz. Gesamteiweiß des jeweiligen Serums angibt.

Als normale Werte fanden wir auf diese Weise mit der *Reiss-Rohrer*-Methode für Gesamteiweiß bei 15 männlichen Seren im Mittel 7,9 Proz., für Albumin 4,7 Proz., Globulin 3,1 Proz., für das Albumin-Globulinverhältnis 60 : 40 und für die Viskosität 1,734, bei drei weiblichen Seren im Mittel 8 Proz. Gesamteiweiß, 4,1 Proz. Albumin, 3,9 Proz. Globulin, 53 : 47 Albumin-Globulinverhältnis und 1,801 Viskosität. Mit der *Robertson*-Methode fanden wir als Normalwerte bei sechs männlichen Seren 6,9 Proz. Gesamteiweiß, 4,7 Proz. Albumin, 2,3 Proz. Globulin und 67 : 33 Albumin-Globulinverhältnis. Als Normalwert für die „spezifische Viskositätserhöhung" fanden wir bei sechs männlichen Seren 0,104 im Mittel.

In der Literatur finden wir als Normalwerte für die Methode: *Reiss-Rohrer*: Gesamteiweiß 6,2 bis 9,4 Proz., Albumin-Globulinverhältnis 80 bis 53 : 20 bis 47, Viskosität 1,51 bis 2,1, für die *Robertson*-Methode: Gesamteiweiß 5,8 bis 8,6 Proz., Albumin 4 bis 6,8 Proz., Globulin 1,3 bis 3,5 Proz., Albumin-Globulinverhältnis 95 bis 60 : 5 bis 40. Die Werte scheinen nach Literaturangaben dem Alter nach verschieden zu sein. Auch zwischen den verschiedenen Tierarten scheinen beträchtliche Unterschiede zu bestehen. Schließlich erwähne ich noch, daß *Handowsky* (44) im Sommer mehr Albumin, im Winter mehr Globulin fand, daß hingegen die Höhenlage ohne Einfluß sein soll.

Fibrinogenbestimmung.

Zur Fibrinogenbestimmung benutzten wir die Methode von *Winternitz*. Sie scheint uns von den vielen beschriebenen Methoden die geeignetste zu sein. Mit dem *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer wird der Brechungsindex von Hirudinplasma und dem dazu gehörigen Serum bestimmt und aus der Differenz das Fibrinogen in Grammprozenten errechnet.

Ihre methodisch-technische Grundlage ist nach *Starlinger* (45) hinreichend genau. Die Fehlerquelle beträgt 0,02 g-Proz. Fibrinogen.

Auch der Einwand, daß das in Substanz zugesetzte Hirudin das Brechungsvermögen des Plasmas ändern könnte, ist widerlegt (*Starlinger*). Ferner beseitigte *Hueck* (31) die Hauptbedenken *Starlingers* (46), der annahm, daß Vollblutserum und Nativserum in ihren Eiweißverhältnissen nicht übereinstimmten. *Hueck* (s. oben) zeigte sehr schön, daß zwischen den beiden Seren hinsichtlich ihrer Eiweißverhältnisse keine Unterschiede bestehen.

Die theoretische Grundlage der Methode von *Winternitz* beruht auf der einheitlichen, konstanten und spezifischen Refraktion des Fibrinogens. *Starlinger* und *Hartl* (47) fanden nun, daß diese bei 15 hierüber angestellten Versuchen mit einer Ausschlagsbreite von 0,00078 um den Mittelwert von 0,00169 schwankte, daß also von einer einheitlichen spezifischen Refraktion nicht gesprochen werden kann. Im allgemeinen scheint uns die Methode hinreichend zu sein.

2 ccm des nach obigen Grundsätzen gewonnenen Blutes (von der gleichen Probe, mit der die übrigen Versuche angestellt wurden) wurden in ein mit Hirudin in Substanz beschicktes Zentrifugierglas getan, umgeschüttelt und 5 Minuten zentrifugiert. Von dem abgeheberten Hirudinplasma wurde dann sofort ein Tropfen im *Pulfrich*schen Instrument untersucht. Die Anwesenheit von Plättchen im Plasma soll dessen Brechung nicht beeinflussen (*Starlinger* und *Hartl*). Aus der Differenz der Brechungsindizes dieses Plasmas und des dazugehörigen Serums wurde das Fibrinogen in Grammprozenten durch Division durch 0,00172 errechnet.

Als Normalwerte werden in der Literatur 0,25 bis 0,6 Proz. Fibrinogen angegeben. Auch scheinen bei den verschiedenen Tieren Unterschiede zu bestehen.

Versuche.

Um die Rolle des Albumins, Globulins und Fibrinogens bei der Blutgerinnungszeit zu erforschen, bedienten wir uns zunächst des Experiments, indem wir diese drei Eiweißkörper darzustellen und Blut durch ihren Zusatz hinsichtlich der Gerinnungszeit zu beeinflussen suchten.

Albumin und *Globulin* gewannen wir durch die Dialyse. Reines, hämoglobinfreies Serum wurde in Dialysierhülsen getan und in Aqua dest. gestellt, das Ganze durch Überschichten von Toluol gegen Luftzutritt geschützt. Das Wasser wurde zweimal täglich erneuert, bis die Probe mit Argentum nitr. keine Trübung mehr erkennen ließ, was etwa in 8 bis 14 Tagen erreicht war. Die überstehende Flüssigkeit wurde dann filtriert und mit reinem NaCl bis zu einer 0,9proz. Lösung versetzt.

Bei Zusatz der reinen dialysierten Eiweißfraktionen trat beim Gerinnungsversuch infolge der dadurch bedingten Hypertonie Hämolyse und so starke Beschleunigung der Gerinnung auf, daß die Versuche nicht verwertbar waren.

Als Vergleichsflüssigkeit verwandten wir physiologische Kochsalzlösung.

Leider war es auf diese Weise nicht möglich, eine reine Albuminlösung zu erhalten. Es zeigte sich, daß neben dem Albumin stets Globulin zurückblieb. Ob bei der Dialyse nicht alles Globulin ausfiel [*Hammarsten* (15)] oder ob Teile des Albumins Eigenschaften des Globulins annahmen, ist schwer zu entscheiden. Für letzteres spricht, daß bei der Dialyse sich die absolute Menge des Albumins verminderte, trotz ausfallenden Globulins das Globulin in der Lösung nicht sehr stark abnahm und daß schließlich viele Autoren, allerdings nicht unwidersprochen, vom Übergang des Albumins in Globulin berichten.

Jedenfalls erhielten wir somit eine Lösung, in der die Körper mit Eigenschaften eines Albumins über die mit den Eigenschaften eines Globulins mehr überwogen als gewöhnlich, so daß wir bei Zusatz derselben zum Blute eine Verschiebung des Albumin-Globulinverhältnisses zugunsten des Albumins erzielten.

Der in der Dialysierhülse zurückgebliebene Niederschlag wurde mit einer Normalserummenge ausgespült, die gerade ausreichte, um das Globulin zu lösen.

Wir verwandten Serum zur Auflösung, weil es uns nur damit glückte, den Niederschlag wieder in Lösung zu bringen. Physiologische Kochsalzlösung erwies sich als ungeeignet, weil das Globulin auch nach vielfachem Filtrieren so lange wieder ausfiel, bis es restlos verschwunden war.

In der Globulin-Serumlösung fand sich dann mit der *Robertson*- und *Reiss-Rohrer*-Methode eine starke Zunahme des Globulins im

Gegensatz zu dem gleichen Serum ohne Globulinzusatz, das wir als Vergleichsflüssigkeit benutzten, während das Albumin konstant blieb.

Es glückte zwar auch mit Serum nicht immer, das Globulin wieder ganz in Lösung zu bringen, besonders nicht nach langer Dialyse. Nach *Hammarsten* (s. oben) gehen mehrere Globuline bei Stehen unter Wasser leicht in Albuminate über, die in Neutralsalzlösungen unlöslich sind.

Die so gewonnenen Lösungen mußten möglichst bald zu Versuchen verwandt werden, da sich beim Stehenlassen das Globulin nicht in Lösung hielt. Es wurden nur Lösungen verwandt, in denen das Globulin gut gelöst war, wegen der Möglichkeit der mechanischen Gerinnungsbeschleunigung. Vor jedem Versuch wurden die Lösungen doppelt filtriert.

Das *Fibrinogen* gewannen wir nach *Hammarsten* (15). Die so dargestellte Fibrinogenlösung wurde dann filtriert, auf ihren Kochsalzgehalt geprüft und bis zur physiologischen Kochsalzkonzentration verdünnt. Als Vergleichsflüssigkeit verwendeten wir physiologische Kochsalzlösung.

Beim Zusetzen der Lösungen zum Blute wurde mit peinlichster Sauberkeit und Genauigkeit gearbeitet. Vor jedem Versuch wurden die drei Lösungen filtriert. Die Pipetten und Bechergläser wurden paraffiniert. Zu den Vergleichsbestimmungen benutzten wir immer ein und dieselbe Pipette.

Zunächst wurden die Lösungen abgemessen und ins Becherglas getan, dann erst das Blut entnommen und dazugetan, wodurch wir eine gute Mischung der Lösungen erhielten.

Auf 10 Teile Blut nahmen wir etwa 1 bis 2 Teile *isotonischer Albuminlösung*, zum Vergleich gleiche Teile physiologischer Kochsalzlösung. Bei größeren Mengen der Lösung machte eine gute Durchmischung mit dem Blute Schwierigkeiten infolge rascher Sedimentierung der Körperchen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren nicht eindeutig. Zum Teil erhielten wir eine Verzögerung der Gerinnung, die ungefähr der Globulinvermehrung durch die in der Albuminlösung zurückgebliebenen Globuline entsprach. Zum Teil erhielten wir eine starke Gerinnungsbeschleunigung, deren Ursache in der Albuminfraktion gelegen sein mußte, wobei unentschieden blieb, ob Änderungen des Dispersitätsgrades der Albuminlösung infolge der Dialyse oder solche chemischer Art dafür verantwortlich zu machen seien.

Von dem in Serum gelösten *Globulin* nahmen wir etwa 0,5 bis 1,0 Teile auf 10 Teile Blut. Bei größeren Mengen Globulinlösung wirkte das in ihr enthaltene Serum so sehr gerinnungsbeschleunigend, daß die Werte unmeßbar wurden. Die Ergebnisse siehe in Tabelle VII.

Tabelle VII.

Fälle	Gerinnungszeit	Reiss-Rohrer Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	η
1. 11. VII. (Globulin vom Hund)						
18 Blut G : 2 Serum G . . .	3′	8,9	4,3	4,6	48 : 52	1,950
18 „ „ : 2 Globulinlösung G	3 5″	9,0	4,1	4,9	45 : 54	1,990

Bei den methodisch einwandfreien Versuchen fanden wir eine deutliche Globulinvermehrung mit einer entsprechenden (s. Tabelle IX) Gerinnungsverzögerung. Bei einem Versuch (mit Kontrollversuch) mit einer anderen Globulinlösung fanden wir eine Gerinnungsbeschleunigung von 50 Proz. ohne eine wesentliche Änderung des Globulins, die vielleicht durch die an die Globuline adsorbierten Phosphatide erklärt werden kann (s. *Hammarsten*, S. 2), da die Gerinnungsbeschleunigung in gar keinem Verhältnis zu den Veränderungen der Eiweißkörper stand.

Von der *Fibrinogenlösung* schließlich nahmen wir 1 bis 3 Teile auf 10 Teile Blut. Größere Mengen ließen sich nicht mit dem Blute mischen. Die Ergebnisse siehe in Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Fälle	Gerinnungszeit	Gesamt-Eiweiß (*Reiss*) g-Proz.	Fibrinogen g-Proz.
1. 28. VII. (Rinderfibrinogen I)			
10 Blut L : 1 physiologische Kochsalzlösung . .	3′		
10 „ „ : Fibrinogenlösung	3 15″		
2. 26. IX. (Rinderfibrinogen II)			
8 Blut G : physiologische Kochsalzlösung . . .	12′	6,6	0,44
8 „ „ : Fibrinogenlösung	12 15″	6,6	0,54

Wir sehen also bei methodisch einwandfreien Versuchen eine deutliche Gerinnungsverzögerung bei Fibrinogenzusatz. Die kurzen Gerinnungszeiten im ersten Falle wurden durch Gewebssaft hervorgerufen, der bei der Blutentnahme mit in die Spritze geriet.

Wir verwandten hier Albumin, Globulin und Fibrinogen von Kaninchen, Hunden und Rindern. Da die Ergebnisse mit denen beim Menschen parallel gehen (s. Tabelle VII bis X), scheint uns gegen die Verwendung nichts im Wege zu stehen.

Untersuchungen an Gesunden und Kranken.

Bei einem Falle von genuiner Pneumonie fanden wir am Ende des Fieberstadiums *verlängerte* Gerinnungszeit, Fibrinogen und Globulin

vermehrt, Gesamteiweiß erniedrigt, das Albumin-Globulinverhältnis stark zugunsten des Globulins verschoben.

Guter Übereinklang mit den hierüber vorliegenden Literaturangaben.

Bei einer leichten Bronchopneumonie mit Myodegeneratio fanden wir *normale Werte*. Bei einem Typhus in der ersten Krankheitswoche war das Fibrinogen relativ hoch, das Gesamteiweiß vermindert, Albumin stark vermindert, Globulin normal und das Albumin-Globulin-Verhältnis zugunsten des Globulins verschoben, bei einem Paratyphusrekonvaleszenten sahen wir *normale Werte*.

Nägeli (3) fand bei Typhus normalen Fibrinogengehalt, *Lester, James, Davidson* und *Frazier* (48) Verminderung.

Bei einem Fall von Meningitis mit hohem Fieber sahen wir *verlängerte* Gerinnungszeit, Gesamteiweiß niedrig normal, Fibrinogen normal, Albumin stark vermindert und Globulin *vermehrt*, also eine Verschiebung des Albumin-Globulinverhältnisses zugunsten des Globulins.

Ein Mann mit einer Endokarditis lenta, der gleichzeitig eine Lues hatte, zeigte normale Eiweißverhältnisse.

Bei einem leichteren Fall von Phthise fanden wir normale Eiweißwerte, bei einer exsud. progred. Phthise einer Seite mit Pneumothorax eine geringe Vermehrung des Fibrinogens und geringe Verschiebung des Albumin-Globulinverhältnisses zugunsten des Globulins. Eine exsud. progres. Form mit Knochentuberkulose zeigte Fibrinogenvermehrung, Globulingehalt an der *oberen Grenze* des normalen, Albumin vermindert, eine starke Verschiebung zur Seite des Globulins und eine Gerinnungszeit, die an der *oberen Grenze* des Normalen lag. Eine Phthise im Endstadium zeigte eine Verminderung des Gesamteiweißes und Albumins bei normalem Fibrinogen und Globulin, also eine starke Verschiebung zur Globulinseite. Bei einem Fall von tuberkulöser Nephritis mit Abszessen und Amyloidose fanden wir Eiweißverminderung auf Kosten des Albumins und eine starke Vermehrung des Fibrinogens.

Unsere Werte stehen somit in gutem Übereinklang mit der hierüber vorliegenden Literatur.

Bei Infektionskrankheiten scheint im allgemeinen das Globulin und die Gerinnungszeit im Inkubationsstadium *normal* zu sein. Im Fieberstadium scheint eine *Globulinvermehrung* mit *verlängerter* Gerinnungszeit und *vermehrtem oder normalem* Fibrinogen zu bestehen. In der Rekonvaleszenz scheinen Globuline und Gerinnungszeit zu *subnormalen* Werten zu sinken.

Bei einer tubulären Nephritis sahen wir eine verlängerte Gerinnungszeit.

Globulin und Fibrinogen sollen bei Nephritis *normal* oder *vermehrt* sein, bei verringertem Albumin und Gesamteiweiß. *Takasaki* (10) fand *normale* und *verlängerte* Gerinnungszeit.

Bei einer beginnenden Schrumpfniere sahen wir niedrig *normalen* Globulingehalt und eine *niedrig normale* Gerinnungszeit, bei einer fortgeschrittenen sahen wir *normale* Werte. Beide hatten einen Fibrinogengehalt an der oberen Grenze des Normalen. Ein Fall von Schrumpfniere mit Herzinsuffizienz und Ödemen zeigte alle Werte *erniedrigt* bei normalem Albumin-Globulinverhältnis und Fibrinogen. Bei einem Fall von perniziöser Anämie, der gleichzeitig eine Lues und Cystitis aufwies, fanden wir Gesamteiweiß und Albumin erniedrigt bei *niedrig normalem Globulingehalt und Gerinnungszeit.*

[*Gram* (49), (50) und *Holzer* und *Schilling* (51) fanden eine verlängerte Gerinnungzseit.]

Bei einem Fall von Polycythaemia vera fanden wir *sämtliche Werte hoch normal.*

Vermehrten Globulingehalt und *verlängerte* Gerinnungszeit fanden *Epstein* (52), *Laubry* und *Donner* (53), (54), *Herrenheiser* und *Luedin* (52). Hingegen fand *Nägeli* einen nur geringen Eiweißgehalt und *Nägeli, Högler* und *Gaisböck* (52) beschleunigte Gerinnungszeit.

Hierher gehört ferner ein Befund von *Leschke* (55) und *Rosin* (8), die bei Morbus Werlhof eine *normale* Gerinnungszeit bei *normalem* Fibrinogen fanden.

Bei einem Fall von Carcinom mit Ikterus fanden wir normale Werte.

Die Angaben in der Literatur berichten von normalem oder vermehrtem Globulingehalt und vermehrtem Fibrinogen.

Wir sahen in einem Fall von Gravidität *niedrig normalen* Globulingehalt und eine *niedrig normale* Gerinnungszeit bei sonst normalen Verhältnissen.

Hafner (56) fand erhöhtes, *Bergmann* (57) erniedrigtes Gesamteiweiß. Nach ersterem ist das Globulin relativ vermehrt, nach *Nägeli* (3) das Fibrinogen inkonstan vermehrt.

Zu diesem Abschnitt gehören noch einige Literaturangaben, die von Parallelen zwischen Gerinnungszeit einerseits und Globulin und Fibrinogen andererseits berichten. Bei *M. Basedow* soll nach vielen Autoren das Globulin *vermehrt* und die Gerinnungszeit *verlangsamt,* bei Myxödem das Fibrinogen *vermindert und die Gerinnung beschleunigt* sein.

Gegen eine Parallele zwischen Globulin und Fibrinogen einerseits, Gerinnungszeit andererseits spricht keine von uns gefundene Literaturangabe.

Bei der Zusammenstellung unserer Befunde an Kranken und Gesunden finden wir eine weitgehende Parallele zwischen Gerinnungszeit einerseits und den Plasmaglobulinen (Globulin + Fibrinogen) andererseits (s. Tabelle IX).

Tabelle IX.

Fälle	Gerinnungszeit	Fibrinogen	Methode *Reiss-Rohrer*					Methode *Robertson*						Bemerkungen
			Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	η	Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	(η)*)	Gesamtplasma Globuline	
1. *Buchner*, Schrumpfniere mit Herzinsuffizienz u. Ödemen	*4' 30"*	0,47	5,0	1,95	3,05	39 : 61	1,500	4,5	3,0	*1,5*	67 : 33	0,107	*1,97*	
2. *Fritz*, gesund	*5 20*	0,30	7,4	4,4	3,0	59 : 41	1,685	6,4	4,8	*1,6*	75 : 25	0,104	*1,90*	
3. *K.*, Tbc-nephritis und Abszeß m. Amyloidose	*5 30*	0,84	6,05	2,1	3,95	35 : 65	1,63	—	—	—	—	—	—	
4. *Engel*, Schrumpfniere	*5 35*	0,53	7,8	4,4	3,4	56 : 44	1,750	7,0	5,3	*1,7*	76 : 24	0,104	*2,23*	
5. *Fr. Ohnemuss*, Gravidität	*5 40*	0,43	8,0	4,3	3,7	54 : 46	1,790	7,2	5,2	*2,0*	72 : 28	0,104	*2,43*	
6. *Jähnke*, Perniz. Anämie, Lu., Cystitis	*6 0*	—	5,8	3,1	2,7	54 : 46	1,535	5,4	3,6	*1,8*	67 : 33	0,095	—	
7. Dr. *L.*, gesund	*6 25*	0,32	7,9	4,1	3,8	52 : 48	1,790	7,3	5,3	*2,0*	73 : 27	0,105	*2,32*	
8. *Schindler*, Paratyphus-rekonvaleszent	*7 15*	—	6,6	3,0	3,6	46 : 54	1,650	6,1	4,1	*2,0*	67 : 33	0,103	—	
9. Dr. *M.*, gesund	*7 15*	0,22	7,8	5,0	2,8	64 : 36	1,710	6,6	4,3	*2,3*	65 : 35	0,105	*2,52*	
10. *Herschaft*, Bronchopneumoie und Myodegeneratio	*7 15*	0,56	7,5	3,0	4,5	40 : 60	1,800	6,1	3,9	*2,2*	64 : 36	0,128	*2,76*	
11. *Fräßle*, Schrumpfniere	*7 25*	0,56	9,2	4,3	4,9	47 : 53	2,080	8,1	5,8	*2,3*	72 : 28	0,131	*2,86*	
12. *Rudmann*, Phthise	*7 30*	0,50	8,0	2,6	5,4	33 : 67	1,900	6,6	4,0	*2,6*	61 : 39	0,134	*3,10*	
13. Dr. *E.*, gesund	*8 15*	—	7,9	4,7	3,2	60 : 40	1,740	—	—	—	—	—	—	
14. Dr. *E.*, gesund	*8 45*	0,23	8,15	5,2	2,95	64 : 36	1,750	6,8	3,9	*2,9*	57 : 43	0,107	*3,13*	
15. *Rolle*, Ca mit Icterus	*9 15*	—	8,1	2,6	5,5	32 : 68	1,925	6,9	4,3	*2,6*	62 : 38	0,131	—	Ikterisch
16. *Leiber*, Nephritis	*9 25*	0,54	8,3	2,5	5,8	30 : 70	1,980	7,1	4,9	*2,2*	69 : 31	0,135	*2,74*	Stark lipämisch
17. *Schäk*, Phthise	*9 45*	0,63	7,8	1,7	6,1	22 : 78	1,930	6,2	3,1	*3,1*	50 : 50	0,147	*3,73*	
18. *Braun*, Meningitis	*10 15*	0,49	8,4	2,3	6,1	27 : 73	2,040	6,2	2,6	*3,6*	42 : 58	0,165	*4,09*	
19. *Volk*, Pneumonie	*10 15*	0,72	5,55	0,0	5,55	0 : 100	1,700	4,6	1,2	*3,4*	26 : 74	0,148	*4,12*	
20. *Schwörer*, Phthise	*10 30*	0,91	8,65	2,95	5,7	34 : 66	2,080	7,0	3,4	*3,6*	49 : 51	0,151	*4,51*	

*) (η) = spezifische Viskositätserhöhung nach *Petschacher*.

Die mit — versehenen Rubriken wurden wegen Materialmangels nicht untersucht. Aus der Reihe der Werte fallen nur Fall 15 und 16 heraus. Scheinbar war durch den Ikterus und durch die starke Lipämie die Brechung so verändert, daß die Eiweißwerte von der refraktometrischen Methode nicht richtig erfaßt wurden.

Tabelle X.

Kaninchen	Gerinnungszeit	Gesamt-Eiweiß g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin-Globulin-verhältnis	(η)	
1. 4. IV.	*13' 00''*	6,9	5,4	*1,5*	78 : 22	1,54	Methode *Reiss-Rohrer*
2. 25. V.	*13 15*	6,0	4,1	*1,9*	69 : 31	1,50	
3. 29. VI.	*15 00*	7,0	4,2	*2,8*	60 : 40	1,64	
4. 25. VI.	*16 30*	6,0	2,7	*3,3*	45 : 55	1,59	

Tabelle X zeigt die gleichen Ergebnisse bei vier von uns untersuchten Kaninchen (Karotidenblut), wie wir sie beim Menschen fanden.

Zusammenfassung.

Wir sahen schon in der Literatur Parallelen zwischen der Gerinnungszeit und den Plasmaglobulinen, dem Globulin und Fibrinogen.

Zwischen Globulin und Gerinnungszeit bei der Wirkung von Schilddrüsensubstanz (S. 355 und 358), bei Eiweißinjektionen (S. 358), bei Gelatineinjektionen (S. 358), zwischen Gerinnungszeit und Fibrinogen bei Pankreasgangunterbindung (S. 355), zwischen Senkungsgeschwindigkeit, Globulin und Gerinnungszeit bei Scharlach (S. 356) und schließlich bei der großen Fülle der Angaben über die Werte bei den verschiedenen Krankheiten.

Unsere experimentellen Untersuchungen zeigen, daß man durch Globulin- und Fibrinogenzusatz zum Blute in vitro eine deutliche Gerinnungsverzögerung erzielen kann. Damit übereinstimmend ergaben die Blutuntersuchungen am Kaninchen und gesunden und kranken Menschen eindeutig eine Parallele zwischen Gerinnungszeit und Globulin, besser noch zwischen Gerinnungszeit und den Plasmaglobulinen (dem Serumglobulin + dem Fibrinogen).

Die Versuche und Untersuchungen sprechen dafür, daß die Gerinnungszeit in vitro im allgemeinen sich bei Verschiebung das Albumin-Globulinverhältnis zugunsten des Globulins erhöht und umgekehrt, daß sie aber im besonderen von der Menge der Plasmaglobuline abhängt.

Serumglobulin und Fibrinogen scheinen dabei in gleichem Maße beteiligt zu sein. Wieweit auch andere Blutbestandteile daran beteiligt sind, lassen wir dahingestellt.

Literatur.

1) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 28, 1922. — 2) Diese Zeitschr. 139, 1923. — 3) Lehrb. d. Blutkrankheiten u. Blutdiagnostik 1919. — 4) Med. Klinik 19, 1923. — 5) C. r. des séances de la soc. de biol. 86, 1922. — 6) Geneesk. tijdschr. v. Nederlandsch.-Ind. 64, 1924. — 7) Medycyna doswiadczalnai spoleozna 2, 1924. — 8) *Kraus-Brugsch*, Spez. Pathol. u. Ther. 8, 1920. — 9) Arch. internat. de physiol. 21, 1923. — 10) Mitteil. a. d. med. Fakultät d. Univ. Tokio 30, 1924. — 11) C. r. des séances de la soc. de biol. 90, 1924. — 12) Ann. de méd. 15, 1924. — 13) Diese Zeitschr. 122, 1921. — 14) Deutsch. med. Wochenschr. 51, 1925. — 15) Lehrb. d. physiol. Chem. 1914. — 16) Diese Zeitschr. 139, 1923. — 17) Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. IV, Teil 3, H. 2, 1923. — 18) Diese Zeitschr. 126, 1921. — 19) Biochem. Handlex. 4. — 20) Zeitschr. d. f. ges. exper. Med. 41, 1924. — 21) Ebendaselbst 28, 1922. — 22) Ebendaselbst 29, 1922. — 23) Fol. med. Jahrg. 9, 1923. — 24) C. r. des séances de la soc. de biol. 84, 1921. — 25) Klin. Wiochenschr. 2, 1923. — 26) Schweiz. med. Wochenschrift 55, 1925. — 27) Wien. klin. Wochenschr. 37, 1924. — 28) C. r. des séances de la soc. de biol. 84, 1921. — 29) Diese Zeitschr. 130, 1922. — 30) Beitrag z. Klinik d. Tub. 48, 1921. — 31) Diese Zeitschr. 159, 1925; 160, 1925. — 32) Ebendaselbst 28, 1922. — 33) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 47, 1925. — 34) Ebendaselbst 47, 1925. — 35) Inaug.-Dissert. Freiburg i. Br. 1923. — 36) Diese Zeitschr. 160, 1925. — 37) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 36, 1923. — 38) Schweiz. med. Wochenschr. 52, 1922. — 39) Ebendaselbst 52, 1922. — 40) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 144, 1924. — 41) Diese Zeitschr. 148, 1924. — 42) Klin. Wochenschr. 2, 1923. — 43) Diese Zeitschr. 131, 1922. — 44) Münch. med. Wochenschr. 71, 1924. — 45) Diese Zeitschr. 140, 1923. — 46) Ebendaselbst 143, 1923. — 47) Ebendaselbst 157, 1925. — 48) Transact. of the assoc. of Amer. Physiol. 39, 1924. — 49) C. r. des séances de la soc. de biol 83, 1920. — 50) Bull. of Johns Hopkins hosp. 31, 1920. — 51) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 139, 1922. — 52) Erwähnt bei *Dehner*, Inaug.-Dissertat. Freiburg i. Br. 1925. — 53) Bull. et mém. de la soc. méd. des hôp. de Paris 37, 1921. — 54) Ann. de méd. 10, 1921. — 55) Deutsch. med. Wochenschr. 51, 1925. — 56) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 101, 1924. — 57) Zentralbl. f. Gynäk. 48, 1924.

Über die Wirkung der Neutralsalze auf das Durchdringen der OH'-Ionen durch das Pflanzenplasma. II.

Von

Jaan Port.

[Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des botanischen Instituts zu Tartu (Dorpat)].

(Eingegangen am 5. Februar 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Über die Permeabilitätsverhältnisse des Pflanzenplasmas für die OH'-Ionen sind einige Bemerkungen in den Arbeiten von *Pfeffer* und *Overton*, etwas erweiterte von *N. Harvey* und *Brenner*, zu finden. Nach diesen Angaben können die OH'-Ionen der stark dissoziierten Basen sehr schwer (ob überhaupt?) in das lebende Plasma eindringen, die Ionen der schwach dissoziierten aber verhältnismäßig leicht, wobei die Zellen bei letzteren nicht getötet werden. Nach *Lepeschkin* wirken die OH'-Ionen in schwachen Konzentrationen auf das Plasma deshalb nicht schädigend, weil sie die Denaturation des Plasmas und dessen Zersetzung verhindern.

Über die Wirkung der Neutralsalze auf das Durchdringen der OH'-Ionen durch das Pflanzenplasma sind mir die Literaturangaben nicht zugänglich gewesen. Deswegen wollte ich diese Frage näher untersuchen. Die Versuche wurden nach denselben Methoden und mit demselben Objekt (dunkelvioletten Kronblättern von Viola tricolor f Dr. Faust) ausgeführt, über welche schon in der ersten Mitteilung „Über die Wirkung der Neutralsalze usw." in dieser Zeitschr. **166**, H. 1/3, berichtet worden ist.

Untersucht ist bisher die Wirkung der Neutralsalze bei NH_4OH, CH_3NH_3OH und KOH.

1. Die Versuche mit NH_4OH + Neutralsalzen.

Die Versuche wurden mit den niedrigsten Konzentrationen des NH_4OH durchgeführt, und zwar solchen, bei denen die OH'-Ionen noch nach 1 Stunde in die Zelle hineindrangen: 0,0005 n und 0,001 n. Bei höheren Konzentrationen dringen die OH'-Ionen so rasch in die Zellen ein, daß man

das Eindringen nicht mehr genau zeitlich verfolgen kann, ebenso ist es auch bei diesen Konzentrationen schwerer, die Wirkung der Salze auf die Permeabilität des Plasmas für OH′-Ionen zu bestimmen. Die Konzentration der Salze war 0,1 n, und bei den Versuchen mit gleichem p_H 0,1 mol. Nachdem das Anthocyan des Zellsaftes von OH′-Ionen in erwähnten Konzentrationen aus dem violetten Ton in blauen umgeschlagen wurde, blieben die Zellen bei allen Versuchen [außer $Mg(NO_3)_2$] noch vollständig am Leben und zeigten sogar dann noch eine gute Plasmolyse, nachdem sie 10 bis 15 Stunden in den Untersuchungslösungen gelegen hatten.

Tabelle I.

NH_4OH + Salze (0,001 bis 0,0005 n NH_4OH + 0,1 n Salze).

	CNS	Br	NO_3	Cl	J	SO_4	CH_3COO
NH_4	++		+	+		(+)	
K		—	—	—	—		—
Na	(—)	(—)	—	—		=	
Li		—	—	—			
Mg			(—)	=	=	=	
Ca	—		=	=			

In der Tabelle I sind die Versuchsresultate mit NH_4OH + Neutralsalzen zusammengefaßt.

Hier deuten ++ und +, daß das Eindringen der OH′-Ionen mit angegebenem Salze stark bzw. schwach gefördert, — und = schwach bzw. stark gehemmt wird.

Daraus sieht man 1. daß *NH_4-Salze* das Durchdringen der OH′-Ionen *fördern*. Aus den Protokollen ist ersichtlich, daß das Durchdringen der NH_4-Salze in der folgenden Reihenfolge der Anionen zustande kommt: CNS > NO_3, Cl > SO_4, so daß bei der Anwesenheit des NH_4CNS der Farbenumschlag des Anthocyans in blau fast momentan erfolgt.

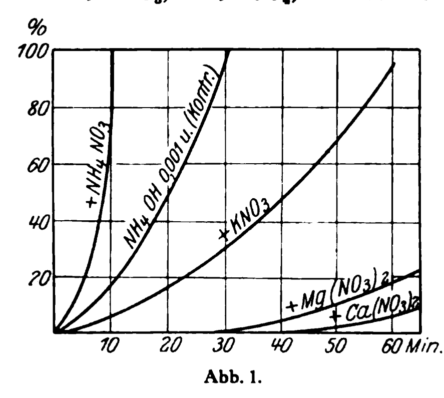


Abb. 1.

2. Die *K-*, *Na-*, *Li-Salze* und *$Ca(CNS)_2$ hemmen* das Durchdringen der OH′-Ionen. Die Hemmung folgt im ganzen nach der Anionenreihe: CNS < Br < NO_3 < Cl < J < CH_3COO < SO_4.

3. Die Mg- und Ca-Salze [ausgenommen $Ca(CNS)_2$ und $Mg(NO_3)_2$] *hemmen stark* das Durchdringen der OH′-Ionen.

Wie die Nitrate auf das Durchdringen der OH′-Ionen wirken, kann man in Abb. 1 verfolgen, wo auf der Ordinatenachse die Prozente der Zellen, deren Anthocyan durch OH′-Ionen umgeschlagen, auf der Abszissenachse die Zeit des Umschlags angegeben ist[1]).

[1]) Ebenso sind gezeichnet die folgenden Abb. 2, 3 u. 4.

$Mg(NO_3)_2$ wirkt nach 10 bis 15 Stunden auf das Plasma schwach giftig, die Zellen fangen an zu sterben und die Anthocyanfarbe geht dabei in grün über. Nach den Angaben von *Brenner* ist $Mg(NO_3)_2$ auch in neutraler Lösung für das Pflanzenplasma giftig. Mit $H^{\cdot}$-Ionen zusammen bzw. in saurer Lösung, konnte ich aber keine Giftwirkung des $Mg(NO_3)_2$ konstatieren[1]).

Da die Ba- und Sr-Salze mit NH_4OH einen Niederschlag geben, so sind die Angaben dieser Salze mit anderen nicht gut vergleichbar und deshalb in Tabelle I nicht angedeutet. Die *Sr-Salze hemmen sehr stark* das Eindringen der OH'-Ionen in die Zelle, *Ba-Salze* aber üben eine *sehr schwache Hemmung* aus, bedeutend schwächer als die K- und Na-Salze. Nach 10 bis 15 Stunden kann man bei den Ba-Salzen noch keine Giftwirkung wahrnehmen, nach 24 Stunden sind aber die Zellen in NH_4OH + Ba-Salzlösungen zugrunde gegangen, während sie in der Kontrollösung noch vollkommen gesund blieben.

Um festzustellen, wie weit die Neutralsalze die p_H-Konzentrationen herabsetzen und ob die Permeabilitätsverhältnisse des Plasmas nicht von OH'-Ionenkonzentrationsveränderungen abhängig sind, wurden bei allen Versuchslösungen die p_H-Werte bestimmt.

Tabelle II.

p_H-Tabelle (NH_4OH, p_H = 7,95), 17,5° C.

	CNS	Br	NO_3	Cl	J	SO_4	CH_3COO
NH_4	7,40		7,40	7,40		7,4	
K	7,80	7,8	7,80	7,80	7,80	7,7	8,0
Na	7,75	7,8	7,80	7,80		7,7	
Li				7,80			
Mg			7,75	7,75	7,55	7,7	
Ca	7,80		7,80	7,75			

In der Tabelle II sind diese p_H-Werte der 0,001 n NH_4OH + Salze (0,1 n) angegeben. p_H des 0,001 n NH_4OH ist 7,95. Man sieht aus diesen Angaben, daß die NH_4-Salze, die das Durchdringen der OH'-Ionen fördern, die OH'-Ionenkonzentration stark herabsetzen. Bei anderen Salzen ist die Herabsetzung der OH'-Ionenkonzentration geringer und mehr oder weniger gleichmäßig. Da in reinem NH_4OH, bei p_H 7,8, die Anthocyanfarbe verhältnismäßig langsam und schwach ins Blaue übergeht, ist es sehr eigenartig, daß sie in NH_4OH + NH_4-Salzlösungen bei p_H 7,4 jedoch sehr rasch und stark umgeschlagen wird.

Die anderen Salze, die das Durchdringen der OH'-Ionen hemmen, setzen die p_H-Werte schwächer herab, als die NH_4-Salze, und dabei die Alkalisalze — die schwach hemmen — auch schwächer (p_H etwa 7,8), als die Mg- und Ca-Salze und Sulfate der Alkalisalze. (p_H 7,75—7,7).

So kann man im ganzen den großen Unterschied in den Permeabilitätsverhältnissen des Plasmas bei NH_4-Salzen (fördern!) und Mg- und Ca-Salzen (hemmen stark!) nicht einfach durch Veränderungen der OH'-Ionenkonzentrationen erklären.

---

[1]) *J. Port*, diese Zeitschr. **166**, 105, 1925.

Um die Abhängigkeit der erwähnten Permeabilitätsverhältnisse von den OH'-Ionenkonzentrationen noch näher zu verfolgen, wurden einige Serien von Versuchen bei gleichem p_H angestellt.

Tabelle III.

NH_4OH + Salze, $p_H = 8,0$.

	CNS	Br	NO_3	Cl	J	SO_4	CH_3COO
NH_4	++		++	++		++	
K		(—)	(—)	(—)			
Na	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
Li			(—)	(—)		(—)	
Mg			=	=		=	
Ca			=	=			

In der Tabelle III sind die Resultate der Versuche bei gleichem p_H 8,0 angegeben (Konzentration der Salze 0,1 m). Daraus sieht man nämlich, daß die Ergebnisse im ganzen gleichmäßiger sind, die Verhältnisse bei den fördernden (NH_4-Salzen) und hemmenden Salzen bleiben aber dieselben. So fördern NH_4-Salze verhältnismäßig gleich stark das Eindringen der OH'-Ionen in das Plasma. Die anderen Alkalisalze hemmen fast gleich schwach, während Mg- und Ca-Salze aber eine bedeutend stärkere Hemmung ausüben.

Bei dem gleichen p_H 8,0 ist die Hemmung der Alkalisalze (K-, Na-, Li-) bedeutend schwächer geworden (die p_H-Werte sind gestiegen!), während man bei den Mg- und Ca-Salzen fast keine Verminderung in der Hemmungswirkung konstatieren konnte.

Bemerkenswert ist, daß die Wirkungsverhältnisse der Salze in den erwähnten drei Gruppen bei gleichem p_H in jeder Gruppe fast gleich sind, wie aus der Abb. 2 zu sehen ist.

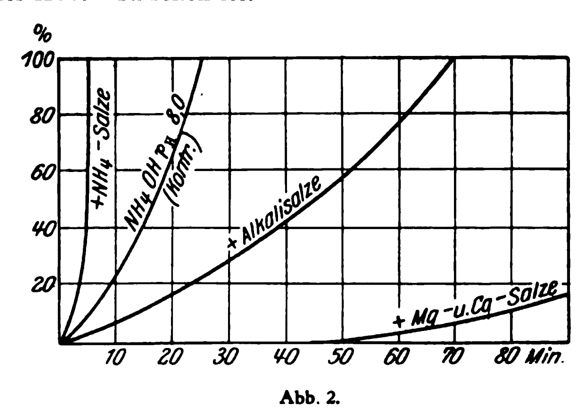


Abb. 2.

2. Versuche mit CH_3NH_3OH + Neutralsalzen.

In CH_3NH_3OH-Lösungen dringen die OH'-Ionen auch leicht in die Zellen ein, das Plasma wird dabei bei niedrigen Konzentrationen nicht

beschädigt, ebenso wie in den entsprechenden NH_4OH-Lösungen. Da aber die Amine sehr leicht sich verflüchtigen, so konnten nur verhältnismäßig kurzdauernde Versuche (bis 1 Stunde) durchgeführt werden, ohne daß die Konzentration der Lösungen — bei zwei- bis dreimaligem Ausnehmen der Schnitte — sich nicht bedeutend vermindert hätte.

Tabelle IV.

CH_3NH_3OH + Salze (0,01 proz. CH_3NH_3OH + 0,1 n Salze).

	CNS	Br	NO_3	Cl	J	Acet.	H_2PO_4	SO_4
NH_4	+		+	+				+
K	(—)	—	—	—	( )	—	?	=
Na		—	—	—				=
Li		—	—	—				=
Rb			—	—				
Cs				—				
Mg			=	=	=			=
Ca	—	$\overline{(—)}$	—	=				

In der Tabelle IV sind die Resultate der Versuche mit 0,01 proz. CH_3NH_3OH + Salze 0,1 n zusammengefaßt, aus denen ersichtlich ist:

1. daß wieder, wie bei NH_4OH, die NH_4-Salze das Eindringen der OH'-Ionen in das Plasma *fördern*.

2. Die K-, Na-, Li-, Rb- und Cs-Salze (außer ihren Sulfaten und Phosphaten) *hemmen* das Durchdringen der OH'-Ionen durch das Plasma verhältnismäßig schwach. Auch die Ca-Salze hemmen fast ebenso schwach (außer $CaCl_2$), so daß man sie auch dieser schwach hemmenden Gruppe anschließen kann.

3. Stark hemmen Mg-Salze, $CaCl_2$ und die Sulfate der Alkalimetalle (s. Abb. 3).

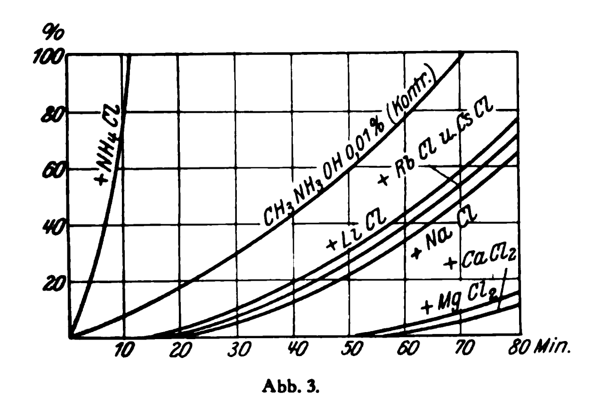


Abb. 3.

Die Monophosphate — als saure Salze — neutralisieren die OH'-Ionen, und deshalb kann man ihnen nicht eine Hemmung durch Veränderung des Permeabilitätszustandes des Plasmas zusprechen. In bezug auf

$Mg(NO_3)_2$ muß man hier noch erwähnen, daß es nach 15 bis 20 Stunden eine schwach giftige Wirkung auf das Plasma ausübt.

Tabelle V.

p_H-Tabelle (CH_3NH_3OH, $p_H = 8,2$), 21° C.

	CNS	NO_3	Cl	Br	Acet.	SO_4
NH_4	7,4	7,45				
K			8,0			
Na	8,0	8,00		8,1	7,1	7,7
Li		8,00				
Rb						
Cs						
Mg		7,80				
Ca		7,50	8,0			

Wie die 0,1 mol. Salze die p_H-Werte der CH_3NH_3OH-Lösungen (p_H 8,2) herabsetzen, kann man in der Tabelle V verfolgen. Hier sind einige Angaben über die p_H-Bestimmungen angegeben. Die p_H-Bestimmungen sind hier folgendermaßen ausgeführt: in je 50 ccm CH_3NH_3OH von p_H 8,2 sind entsprechend 0,1 mol. von jedem Salze in Substanz eingeführt, aufgelöst und nach 14- bis 15stündigem Stehenlassen p_H bestimmt. Da hier die Salzkonzentration 0,1 mol. ist, so stimmen die Angaben mit den Salzen der alkalischen Erden nicht ganz mit denen in der Tabelle IV überein, wo alle Salze 0,1 n sind. Man sieht aus dieser Tabelle, daß die p_H-Werte besonders stark von NH_4-Salzen, CH_3COONa, Na_2SO_4 und $Ca(NO_3)_2$ herabgesetzt werden, von den anderen Salzen aber verhältnismäßig weniger. Mit Verminderung der p_H-Werte durch NH_4-Salze kann das schnelle Eindringen der OH'-Ionen bei erwähnten Salzen nicht erklärt werden, wohl kann man aber auch einige Beziehungen zwischen p_H-Werten und der Stärke der Herabsetzung des Eindringens der OH'-Ionen feststellen, so bei $NaCNS$, $NaNO_3$ (p_H 8,0) schwach, Na_2SO_4 (p_H 7,7) stark, ebenso bei $NaNO_3$ und $LiNO_3$ (p_H 8,0) schwach und $Mg(NO_3)_2$ (p_H 7,8) stark. Gewiß ist hier die Wirkung der Salze auf das Durchdringen der OH'-Ionen nicht bloß allein durch die Herabsetzung der p_H-Werte zu erklären, vielmehr muß man auch durch diese Salze bewirkte kolloidchemische Zustandsänderungen des Plasmas in Betracht ziehen.

Viel genauere Angaben über die Wirkung der Neutralsalze auf das Durchdringen der OH'-Ionen bekommt man aus den Versuchen, wo die p_H-Werte der zu untersuchenden Salz- + CH_3NH_3OH-Lösungen gleich groß sind.

Tabelle VI.

CH_3NH_3OH + Salze bei gleichem p_H 8,4.

	CNS	NO_3	Cl	Br	CH_3COO	SO_4
NH_4	++	++				
K			(—)			
Na	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
Li		(—)				
Mg		=				
Ca		=	=			

Tabelle VI gibt einige Resultate von CH_3NH_3OH + Salze (0 1 mol.) bei gleichem p_H 8,4, die mit den NH_4OH + Salzen bei gleichem p_H 8,0 (Tabelle III) ganz übereinstimmend sind. Man kann auch hier, wie in der Tabelle III, drei Gruppen von Salzen unterscheiden:

1. NH_4-Salze, die stark fördern,

2. Alkalisalze hemmen sehr schwach,

3. Mg- und Ca-Salze hemmen stark das Durchdringen der OH'-Ionen durch das Plasma (s. Abb. 4). Es muß nur darauf hingedeutet werden, daß $Ca(NO_3)_2$ hier fast ebenso stark hemmend wirkt wie $CaCl_2$.

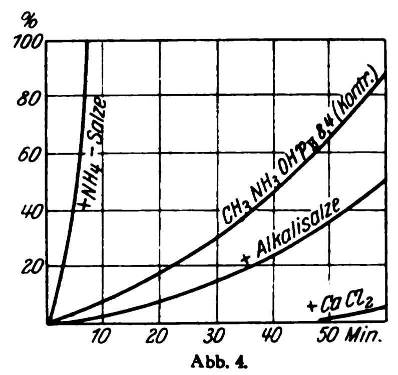


Abb. 4.

8. Die Versuche mit KOH und Neutralsalzen.

Nach den Angaben von *N. Harvey* und *Brenner* dringen die OH'-Ionen, wie gesagt, sehr schwer in die lebenden Zellen ein. In den von *Brenner* ausgeführten Versuchen wurden die Epidermiszellen von Brassica in der 0,02 mol. KOH-Lösung von den OH'-Ionen getötet, unter der 0,01 mol. Konzentration der Lösung drangen sie aber während der 4 Stunden nicht mehr in die Zelle ein, so daß *Brenner* die Konzentration der KOH von 0,01 mol. für das erwähnte Objekt als „kritische“ annahm.

In den von mir ausgeführten Versuchen drangen die OH'-Ionen in 0,05 bis 0,01 n KOH-Lösungen während 1 bis 2 Stunden in die Zellen ein, wobei die Zellen auch dabei getötet wurden (Anthocyanfarben-Umschlag in grün!). In den 0,005 bis 0,001 n Lösungen aber wurde der Farbenumschlag des Anthocyans nur nach 8 bis 12 Stunden bemerkbar und die Zellen blieben nach dem Farbenumschlag noch 1 bis 2 Stunden lang am Leben. Die Versuche mit 0,1 n Neutralsalzen wurden daher bei 0,00125, 0,0025 und 0,005 n Konzentrationen des KOH ausgeführt. Die Versuche dauerten bis 24 Stunden.

Tabelle VII.

KOH + Salze.

	CNS	NO_3	Cl	Br	SO_4
NH_4	0—1	1—5	1—5		1—5
Li		300	1—5	10	100
K	60	20	90	200	120
Na	75	100	300	130	130
Rb		200	300		25?
Cs			300		300
Mg		—	1440		1680
Ca	90	220	300		

In der Tabelle VII sind die Mittelwerte der Zeit in Minuten angegeben in welcher bei 0,005 n KOH 50 Proz. der Zellen ihre Anthocyanfarbe aus Violett in Blau veränderten bzw. OH'-Ionen durch das Plasma in den Zell-

saft gelangten. In der reinen 0,005 n KOH-Lösung (Kontrolle) kam in 50 Proz. von den Zellen der Farbenumschlag des Anthocyans aus Violett in Blau nach 12 Stunden = 720 Minuten zustande.

Aus den in Tabelle VII angegebenen Zahlen sieht man, daß die Verhältnisse hier viel verwickelter sind, als bei den vorher angeführten schwachen Basen.

Nur Mg-Salze hemmen bei KOH das Eindringen der OH'-Ionen durch das Plasma, alle anderen Salze fördern aber. Bei $Mg(NO_3)_2$ drangen die OH'-Ionen nach 24 Stunden überhaupt nicht in die Zellen ein. Nach der Stärke der Förderung kann man die Salze in mehrere Gruppen einteilen, nur ist es aber schwer, diese Gruppierungen nach Kationen oder Anionen durchzuführen.

Man sieht, a) daß *sehr stark fördern* NH_4-Salze, LiCl und LiBr, auch KNO_3 und Cs_2SO_4.

b) *Stark fördern* K-, Na- und Ca-Rhodanide, KCl, NaBr und Li-, K- und Na-Sulfate.

c) *Schwächer fördern* $LiNO_3$, NaCl, RbCl, $CsNO_3$, CsCl, $CaNO_3$ und auch $CaCl_2$. In den letzterwähnten Salz + KOH-Lösungen sterben die Zellen in mehr oder weniger kurzer Zeit nach dem Anthocyanfarbenumschlag.

Ba- und Sr-Salze geben mit KOH einen Niederschlag. Von Ba-Salzen werden die Zellen zuerst getötet, und dann erst findet der Anthocyanfarbenumschlag von OH'-Ionen in den Zellen statt.

Bei den Permeabilitätsveränderungen des Plasmas für OH'-Ionen bei KOH kann man die Kationen nach ihren fördernden Wirkungen im ganzen in folgender Reihe anordnen: $NH_4 > Li > K, Na > Rb > Cs > Ca$. Es ist sehr bemerkenswert, daß nur Mg-Salze hemmend wirken, dabei am stärksten $Mg(NO_3)_2$, das auch hier nicht giftig für das Plasma ist (bei NH_4OH und CH_3NH_3OH ist es schwach giftig!).

KH_2PO_4, das auch hemmend wirkt, neutralisiert nur die OH'-Ionen ($KOH + KH_2PO_4 \longrightarrow K_2HPO_4 + H_2O$).

Tabelle VIII.

p_H-Tabelle (KOH, p_H = 8,15).

	CNS	NO_3	Cl	Br	SO_4	H_2PO_4	CH_3COO
NH_4	7,4	7,40	7,40		7,5		
Li		8,05	8,10		8,0		
K		8,05	8,15	8,1	8,0	?	8,2
Na		8,10	8,15				
Mg		8,05	8,10		7,7		
Ca	8,1	8,00	8,10	8,1			
Ba	8,0	7,30	7,50	7,7			

In der Tabelle VIII sind die p_H-Werte des KOH bei Neutralsalzen angegeben. Aus technischen Gründen (mit erwähntem Komparator konnte nur p_H bis 8,4 bestimmt werden; aus demselben Grunde konnten auch die Versuche mit gleichem p_H nicht ausgeführt werden) sind sie bei bedeutend niedrigeren Konzentrationen des KOH bestimmt, als sie in den Versuchslösungen waren.

Die angegebenen p_H-Werte können nur sehr wenig zu der Erklärung der Permeabilitätsverhältnisse bei KOH und Neutralsalzen beitragen, denn die Verhältnisse sind hier ganz anders als bei NH_4OH und CH_3NH_3OH.

Es ist besonders eigentümlich, daß hier die Ca-Salze (auch Sr-Salze) das Durchdringen der OH'-Ionen nicht hemmen. Ob die Verschiedenheiten bei KOH + Neutralsalzlösungen als etwas besonderes, was die Li-, Sr- und Ca-Salze anbetrifft, auf die Wirkung der angegebenen K'-Ionen zu deuten sind, die hier antagonistisch wirken können, oder ob hier noch andere Gründe zu suchen sind, muß einstweilen offen bleiben.

Zusammenfassung.

1. Die Wirkung der Neutralsalze auf das Durchdringen der OH'-Ionen durch das Plasma der Kronblätterzellen von Viola tricolor ist bei NH_4OH und CH_3NH_3OH im großen und ganzen ganz ähnlich, bei gleichem p_H sogar ganz identisch.

a) Die *NH_4-Salze fördern* bei den erwähnten schwachen Basen das Eindringen der OH'-Ionen in das Plasma nach der Anionenreihe: $CNS > NO_3$, $Cl > SO_4$, obwohl sie die p_H-Werte stark herabsetzen.

b) Die *Alkalisalze* (K, Na, Li, Rb, Cs) *hemmen* das Eindringen der OH'-Ionen nach der Anionenreihe: $CNS < NO_3$,, Cl, $Br < SO_4$.

c) Die *Mg- und Ca-Salze hemmen stark* das Eindringen der OH'-Ionen in die lebenden Zellen.

d) Bei *gleichem p_H-Werte* sind die fördernden und hemmenden Wirkungen der Neutralsalze in jeder erwähnten Gruppe untereinander *fast gleich groß*, so daß hier die spezifische Wirkung der Anionen ausbleibt und nur die der Kationen zum Ausdruck kommt.

2. Bei KOH ist die Wirkung der Neutralsalze in oben erwähntem Sinne viel komplizierter.

a) Nur *Mg-Salze hemmen* hier das Eindringen der OH'-Ionen in die Zellen; *alle anderen Salze fördern.*

b) Am *stärksten fördern NH_4-Salze, LiCl und LiBr, am schwächsten $LiNO_3$, NaCl, RbCl, CsCl, Cs_2SO_4 und $CaCl_2$.*

Zum Schluß möchte ich Herrn Prof. Dr. *H. Kaho* für sein allseitiges Entgegenkommen und insbesondere für die Literaturbeschaffung hiermit meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Über die Alkalibindung des Blutserums im Kindesalter.

Von

Josef Csapó und **Samuel Henszelmann.**

(Aus der mit dem Stefanie-Kinderhospital in Verbindung stehenden Universitäts-Kinderklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 6. Februar 1926.)

Heutzutage ist es allgemein bekannt, daß die Reaktion des Blutserums schwach alkalisch ist, und es scheint auf den ersten Blick paradox zu sein, von der Alkalibindung des Blutserums zu sprechen. Den Hauptbestandteil des Blutserums bilden außer den anorganischen Salzen die Eiweißkörper. Von der Laugenbindung der Eiweißkörper wissen wir, daß diese von der Reaktion des Mediums stark abhängt. Mit der Alkalinität des Mediums steigt die Menge des durch die Eiweißkörper gebundenen Alkalis, um sich schließlich einem Grenzwert zu nähern. Bei der schwach alkalischen Reaktion des Blutserums haben die Serumproteine die maximale Laugenbindung bei weitem nicht erreicht, bei Steigerung der Alkalinität werden von den Serumeiweißkörpern weitere Laugenmengen als Eiweißnatrium gebunden, die maximale Laugenbindung erfolgt bei einem Hydroxylexponenten von 1,8 bis 1,9. Es haben sich schon mehrere Forscher [*Liebermann*, *Bugarszky*, *Manabe-Matula*[1])] mit ähnlichen Eiweißuntersuchungen beschäftigt, die Laugenbindung des Blutserums wurde jedoch bisher nicht untersucht. Wir haben uns also die Frage gestellt: 1. Wie groß ist die Laugenbindung des Blutserums, 2. ist eine Abweichung in der Laugenbindung des Blutserums bei gesunden und kranken Kindern feststellbar?

Die Bestimmung der Laugenbindung des Blutserums ist viel komplizierter als die Säurebindung, da wir bisher über kein Reagens verfügen, welches die Serumproteine mit der an sie gebundenen Lauge quantitativ ausfällt. *Adolf* und *Spiegel*[2]) beschäftigten sich mit der Laugenbindung der Albumosen, aus diesen Untersuchungen ist ersicht-

[1]) *Manabe* und *Matula*, diese Zeitschrift **52**, 369, 1913.
[2]) *Adolf* und *Spiegel*, ebendaselbst **104**, 175, 1920.

lich, daß die maximale Laugenbindung bei einem Hydroxylexponenten von 1,8 bis 1,9 erfolgt. Zu unseren Untersuchungen wählten wir eine ähnliche Laugenkonzentration. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß man aus einer n/10 Lauge durch entsprechende Verdünnung eine etwa 0,03 n Lösung bereitet. Parallel hiermit wird in einem anderen Gefäß eine Lauge von gleicher Konzentration hergestellt, bei der Verdünnung wird hier aber 2,5 ccm Wasser durch 2,5 ccm Serum ersetzt. Nun mißt man die Wasserstoffionenkonzentration beider Lösungen. Aus der Wasserstoffionenkonzentration wird die Hydroxylionenkonzentration berechnet, welche in der serumhaltigen Lauge geringer ist als in der serumfreien. Die Differenz zwischen beiden ergibt die Menge der durch die Serumeiweißkörper gebundenen Lauge.

Methodik.

Aus der Armvene wurden 5 bis 6 ccm Blut genommen und nach Beginn der Retraktion zentrifugiert. Nach Abpipettierung des Serums bestimmten wir den Eiweißgehalt mit dem Refraktometer nach *Pulfrich* und schüttelten das übriggebliebene Serum 10 Minuten lang, um es mit der Luft zu mischen, nachher ließen wir das Serum eine halbe Stunde stehen. Während des Schüttelns zersetzt sich ein Teil des $NaHCO_3$, die freie und aus dem $NaHCO_3$ frei gewordene CO_2 wird durch das Schütteln entfernt und zwischen der CO_2-Tension des Serums und der Luft stellt sich langsam ein Gleichgewicht ein. Die CO_2 stört also bei den Bestimmungen nicht. Hätten wir die Untersuchung bei der ursprünglichen CO_2-Tension des Serums durchgeführt, so hätten wir bei der Laugenbindung auch die CO_2-Tension in Betracht ziehen müssen. Wir wollten zunächst den Zusammenhang zwischen der Laugenbindung und dem Eiweißgehalt feststellen, deshalb wurde die störende Wirkung der CO_2 eliminiert und der Eiweißgehalt in jedem Falle bestimmt. Von dem auf diese Weise vorbereiteten Serum haben wir 2,5 ccm in einen Scheidetrichter von 25 ccm Inhalt mit eingeschliffenem Glasstöpsel überpipettiert, 7,5 ccm n/10 Lauge hinzugesetzt und mit CO_2-freiem destillierten Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Parallel damit wurde in einen zweiten gleich großen Trichter 7,5 ccm n/10 Lauge pipettiert und mit CO_2-freiem destillierten Wasser auf 25 ccm ergänzt. Wir bestimmten dann die Wasserstoffionenkonzentration beider Lösungen auf elektrometrischem Wege, aus dem erhaltenen Werte berechneten wir die Hydroxylionenkonzentration. Die Differenz zwischen der Hydroxylionenkonzentration der serumhaltigen und serumfreien Lösung entsprach der durch 2,5 ccm Serum gebundenen Lauge, welche dann auf 100 ccm umgerechnet wurde. Die durch 100 ccm Serum gebundene Laugenmenge, ausgedrückt in n/100 Lauge, dividierten wir durch die Eiweißprozente. Auf diese Weise erhielten wir einen Quotienten, welcher uns angibt: wieviel Kubikzentimeter n/100 Lauge fällt auf 1 Proz. Eiweiß, wenn wir das Maximum der Laugenbindung erreichen.

Der Gang der Rechnung. Nehmen wir an, daß 2,5 ccm 7,55 Proz. eiweißhaltiges Serum die Hydroxylionenkonzentration von 25 ccm Lauge mit $7,9 \cdot 10^{-3}$ Grammäquivalent verringert hat, 100 ccm Serum würde die Hydroxylionenkonzentration von 1 Liter Lauge um ebensoviel vermindern. 1 Liter Normallauge ergibt im Falle vollständiger Dissoziation 1 Grammäquivalent OH-Ion, folglich entspricht $7,9 \cdot 10^{-3} = 0,0079$ Gramm-

äquivalent OH-Ion 7,9 ccm Normallauge bzw. 790 ccm n/100 Lauge, wovon auf 1 Proz. Eiweiß 104,6 ccm n/100 Lauge fällt. Bei den Berechnungen müssen wir voraussetzen, daß der Grad der Laugendissoziation. während die Hydroxylionenkonzentration derselben sich um $7{,}9 \cdot 10^{-3}$ Grammäquivalent vermindert hat, sich gar nicht oder nur wenig geändert hatte. Die Genauigkeit der Untersuchungen ist, wenn wir alle Fehlerquellen in Betracht ziehen, höchstens 6 bis 8 Proz.

Wir haben insgesamt bei 35 Kindern die Untersuchung durchgeführt, es waren 13 gesunde und 22 kranke Kinder darunter.

1. Gesunde Kinder:

Nr.	Eiweiß Proz.	Gebundene Lauge ccm	Quotient	Nr.	Eiweiß Proz.	Gebundene Lauge ccm	Quotient
1	7,98	880	110,3	8	8,15	900	110,4
2	7,55	790	104,6	9	7,81	880	112,6
3	8,30	830	100	10	8,60	910	105,8
4	7,70	730	94,8	11	7,81	850	108,8
5	7,85	790	100,6	12	7,33	760	103,7
6	8,28	820	99,1	13	7,42	760	103,4
7	7,27	810	107,2				

2. Kranke Kinder:

Nr.	Diagnose	Eiweiß Proz.	Gebundene Lauge ccm	Quotient
1	Tuberculosis pulmonum .	8,82	780	88,4
2	" " . .	8,28	720	86,9
3	" " . .	8,58	790	92,1
4	" " . .	8,71	790	90,7
5	Peritonitis tuberculosa . .	9,44	900	95,3
6	" " . .	8,49	750	88,3
7	Meningitis tuberculosa . .	10,10	930	93,0
8	Pleuritis exsudativa . . .	8,56	800	93,4
9	" " . . .	8,13	720	88,5
10	" " . . .	9,68	900	91,9
11	" " . . .	9,85	850	86,3
12	Lues congenita	7,78	680	90,1
13	" "	8,06	760	93,2
14	" "	7,55	700	92,7
15	" "	8,35	880	103,5
16	Osteomyelitis acuta . . .	8,94	810	90,6
17	Pneumonia crouposa . . .	7,89	720	91,3
18	Malaria	7,11	690	98,4
19	"	8,46	782	92,4
20	Morbus mac. Werlhofii . .	6,79	720	106,0
21	Purpura simplex	8,86	840	94,8
22	Status post encephalitidem	8,64	820	94,9

Die in der Rubrik gebundene Lauge befindlichen Zahlen bedeuten die durch 100 ccm Serum gebundene Laugenmenge und diejenigen in

der Rubrik Quotient die auf 1 Proz. Eiweiß entfallende Laugenmenge in n/100 Lauge ausgedrückt.

Bei gesunden Kindern binden 100 ccm Serum 730 bis 910 ccm n/100 Lauge, von welcher auf 1 Proz. Eiweiß 95 bis 110 ccm fallen. Die Laugenbindung steigt bzw. fällt nach dem Eiweißgehalt. Daß wir zwischen Eiweißgehalt und der Laugenbindung des Blutserums keinen so festen Zusammenhang gefunden haben, wie es bezüglich der Säurebindung besteht, schreiben wir größtenteils einem methodischen Fehler zu. Wir haben oben erwähnt, daß die Genauigkeit der Methode höchstens auf 6 bis 8 Proz. zu setzen ist. Es sind zwei Komponenten, welche bei der Laugenbindung des Blutserums eine Rolle spielen: 1. die Proteine, 2. das $NaHCO_3$. Die zugesetzte Lauge wird im größten Teile durch die Proteine, im geringeren Maße durch das $NaHCO_3$ gebunden. Die Untersuchungen von *Rohonyi*[1]), welche bei der CO_2-Tension der Luft ausgeführt worden sind, haben ergeben, daß 100 ccm Serum im Mittel 142 ccm n/100 $NaHCO_3$ enthält. Das $NaHCO_3$ tritt mit einer chemisch äquivalenten Menge der Natronlauge in Reaktion nach der chemischen Gleichung: $NaHCO_3 + NaOH = Na_2CO_3 + H_2O$. Um in die Laugebindung der Proteine Einsicht zu gewinnen, muß der oben genannte $NaHCO_3$-Wert (142 ccm) von den von uns erhaltenen Werten (730 bis 910 ccm) in Abzug gebracht werden. Dann erhält man Werte bloß für die Laugenbindung der Proteine 588 bis 768 ccm und einen Quotienten von 77 bis 90. Dieser reduzierte Quotient gibt noch immer keinen Aufschluß über die totale Laugenbindungsfähigkeit der Proteine. Die Laugenbindung der Eiweißkörper beginnt, sobald der Wasserstoffexponent des Mediums den isoelektrischen Punkt der Serumeiweißkörper übertrifft. Der isoelektrische Punkt der Serumeiweißkörper liegt zwischen $p_H = 4{,}8$ bis 5,6, während der Wasserstoffexponent des mit der Luft ins Gleichgewicht gesetzten Serums etwa 8,1 bis 8,2 beträgt. Sowohl im nativen als in der genannten Weise vorbereiteten Serum sind schon zahlreiche Eiweiß-Natriummoleküle vorhanden, es ist schon eine beträchtliche Menge von Lauge an die Eiweißkörper gebunden. Diese Laugenmenge sollte man zu unseren reduzierten Werten (588 bis 768) addieren, um die totale Laugenbindungsfähigkeit der Proteine klar zu sehen. Wir werden bei zukünftigen Untersuchungen auch diese Laugenmenge bestimmen.

Aus den bisherigen Untersuchungen können wir folgendes konstatieren: 1. 100 ccm des mit der CO_2-Tension der Luft ins Gleichgewicht gesetzten Serums können noch 730 bis 910 ccm n/100 Lauge binden, bevor das Maximum der Laugenbindung erreicht wird. 2. Der größte Teil der gebundenen Lauge tritt mit den Eiweißkörpern,

[1]) *Rohonyi*, Münch. med. Wochenschr. 1920, S. 1466.

der geringere — wenigstens nach den Berechnungen — mit den $NaHCO_3$ in Verbindung, wobei einerseits Protein-Natrium, andererseits Na_2CO_3 entsteht.

Von den Krankheiten zeigt noch am meisten die Tuberkulose Pleuritis, eine abfallende Tendenz bei dem Quotienten, auch die Werte bei Lues sind etwas unterhalb dem Normalwert. Bei Tuberkulose Pleuritis schwankt der Quotient zwischen 85 bis 95, bei Lues zwischen 90 bis 95. Die Laugenbindung des Blutserums wird außer von dem Eiweißgehalt noch von dem $NaHCO_3$-Gehalt, eventuell von dem schon im nativen Serum an die Eiweißkörper gebundenen Alkaligehalt beeinflußt. Von diesen Faktoren bestimmten wir bloß den Eiweißgehalt, die anderen Faktoren ließen wir außer acht, deshalb können wir uns bezüglich der Ursache der Quotienterniedrigung kein endgültiges Urteil bilden.

Durch die Laugen- und Säurebindung der Proteine können wir in die Menge und das gegenseitige Verhältnis der reaktionsfähigen Amido- und Carboxylgruppen Einsicht gewinnen. Wir wissen heute über die Eiweißchemie der Tuberkulose, Lues usw., daß sie einen Globulinzuwachs verursachen. Es ist die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen, zu ergründen, ob bei diesen Krankheiten außer den Dispersionsveränderungen mit entsprechendem Verfahren strukturchemische Veränderungen nachweisbar sind.

Eine neue Wasserstoffelektrode zur Messung kohlensäurehaltiger Körperflüssigkeiten, insbesondere des Liquors.

Von

Willy Schmitt.

(Aus der medizinischen Universitätspoliklinik, Leipzig.)

(Eingegangen am 8. Februar 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Methode *Hasselbalchs*, nach welcher die wahre Reaktion einer kohlensäurehaltigen Flüssigkeit in einer Atmosphäre gemessen wird, die mit der zu messenden Flüssigkeit im Kohlensäuregleichgewicht steht, erscheint zwar als die idealste, zugleich aber zweifellos als sehr kompliziert. Einfacher ist die Methode von *Michaelis* und *Rona*, wonach die Messung in einer stehenden Wasserstoffblase geschieht. Aber auch diese Methode erscheint für häufige und rasche Messungen immer noch zu umständlich. Daher konstruierte ich eine Wasserstoffelektrode unter Beibehaltung des Prinzips der stehenden Wasserstoffblase, mit der ich in zufriedenstellender Weise arbeiten konnte, so daß ich diese Elektrode hier beschreiben will.

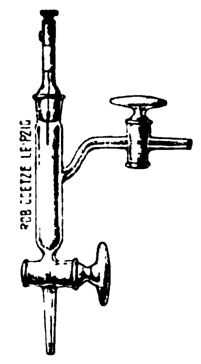


Abb. 1.

Als Elektrode dient ein röhrenförmiger Glasbehälter mit etwa 5 cm langem Hohlraum bei aufgesetztem Glasstopfen, der Durchmesser dieser röhrenförmigen Glaselektrode beträgt etwa 0,9 cm, ihr Gesamtinhalt faßt etwa 2,5 bis 3,5 ccm, gleichfalls bei aufgesetztem Glasstopfen. Die Beschickung der Elektrode kann nach Abheben des Glasstopfens von oben her geschehen, während der untere Glashahn geschlossen ist und *durch den oberen geöffneten Glashahn und das gebogene Röhrchen Wasserstoff in die Glaselektrode einströmt.* Die Zufuhr des letzteren wird in dem Moment durch Schließen des oberen Hähnchens gesperrt, in welchem der Flüssigkeitsspiegel die Einmündung des gebogenen Röhrchens in die röhrenförmige Elektrode überschreitet.

Erreicht schließlich der Flüssigkeitsspiegel den freien oberen Rand des Gefäßes, so wird der Glasstopfen, welcher oben die Klemmschraube, unten die Platinelektrode trägt, fest in den Schliff des Elektrodengefäßchens

eingesetzt, wobei keinerlei Luftbläschen sich zwischen Flüssigkeitsinhalt und Glasstopfen einschieben dürfen; hierzu ist es nötig, daß die Flüssigkeit möglichst mit einem konvexen Spiegel den oberen Rand des Gefäßes überragt, so daß beim Einsetzen des Glasstopfens stets etwas Flüssigkeit an der Außenwand des Elektrodengefäßes herablaufen muß, woselbst man sie mit Fließpapier abtupfen kann. Nunmehr wird das obere Hähnchen *zuerst* und *danach vorsichtig und langsam* das untere Hähnchen geöffnet, in diesem Augenblick steigen langsam kleine Wasserstoffbläschen aus dem gebogenen Röhrchen in das Elektrodengefäß empor, und zwar so lange, bis die Platinelektrode nur noch spurweise in die Flüssigkeit eintaucht; währenddem läuft das entsprechende Flüssigkeitsvolumen durch das untere Hähnchen ab. Ist der Augenblick des spurweisen Eintauchens der Platinelektrode in die zu messende Flüssigkeit erreicht, so schließt man umgekehrt zuerst rasch den unteren, dann den oberen Hahn, schiebt den H-zuführenden Gummischlauch vom Endstück des oberen Hähnchens ab und schüttelt die ganze Elektrode, worauf dieselbe messungsfertig ist. Sie wird vorteilhafterweise zu diesem Zweck in eine geeignete, an einem eisernen Stativ befestigte federnde Metallklemme eingeklemmt, aus der sie infolge ihres geringen Gewichts bequem ebenso rasch wieder herausgehoben werden kann. Als Verbindung mit der Kalomelelektrode dient das U-förmige Röhrchen mit konzentrierter KCl-Lösung, wie es bei der Messung mit der Birnenelektrode und im strömenden Wasserstoff gebräuchlich ist, indem die vorliegende Wasserstoffelektrode mit dem vom unteren Glashahne abwärts verlaufenden und leicht zugespitzten gläsernen Endstück in den einen Schenkel des U-Röhrchens eintaucht.

Wie bei den Elektroden nach *Michaelis* und *Rona* mit stehender Gasblase können auch hier beliebig viel Wasserstoffelektroden nebeneinander aufgestellt und durch eine kleine Glaswanne mit konzentrierter KCl-Lösung mit der Kalomelelektrode in Verbindung gebracht werden. Auch die Reinigung der Elektrode ist nach Abheben des Glasstopfens und Öffnen beider Hähne denkbar einfach. Die Wasserstoffzuführung geschieht durch das obere Hähnchen vermittelst eines Gummiverbindungsstückes vom *Kipp*schen Apparat her, dasselbe kann, wie gesagt, noch vor Beginn der Messung wieder entfernt werden. Sehr zu beachten ist ein *absolut dicht schließender Schliff am Glasstopfen, auch nur im geringsten wackelnde Stopfen beweisen die Undichtheit des Schliffes und damit die Kommunikation der Gasblase mit der Außenluft.* Man kann allenfalls den Stopfen am Schliff ein wenig mit guter Vaseline versehen. Auch der untere Hahn bleibt wie der obere während der Messung geschlossen, da die zwischen den Hahnschliffen befindlichen Flüssigkeitsreste ebenso wie an der Birnenelektrode vollauf zur Stromfortleitung genügen. Auf Anraten des Herrn Prof. *Drucker* vom chemisch-physikalischen Institut der Universität Leipzig verwende ich bei der stehenden Gasblase nicht die sonst im strömenden Gase in der Birnenelektrode so sehr bewährte und dauerhafte *Drucker*sche iridinisierte Goldelektrode, sondern die Platinmohrelektrode, um die richtigen p_H-Werte zu erreichen.

Ganz besonders ist nun diese Form der Wasserstoffelektrode zur Messung nativen Liquors sowie anderer kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten geeignet, sofern dieselben nicht zu schnell gerinnen. Zur Liquormessung wird das Elektrodengefäß bei entferntem Glasstopfen und offenen Hähnen *vermittelst des zugespitzten gläsernen Endstückes am unteren Hahn* durch ein kurzes Gummiverbindungsstück mit der im Duralsack sitzenden Lumbalpunktionskanüle

verbunden, und zwar am einfachsten gleich mit demselben Gummiverbindungsstück, mit dem bei der vorangegangenen Druckmessung das Steigrohr verbunden war; durch seinen Eigendruck, wobei man durch leichtes Senken der Elektrode nötigenfalls nachhelfen kann, steigt nun der Liquor im Elektrodengefäß bis zum freien Rand empor, gleichzeitig aber auch durch das ganze gebogene Röhrchen und das daran anschließende, gleichfalls offene Hähnchen hindurch bis an dessen freie Öffnung, woselbst der Liquor hervortritt und abzutropfen beginnt. Jetzt wird das untere Hähnchen geschlossen, der Glasstopfen fest in den Schliff des Elektrodengefäßes eingesetzt und zuletzt das obere Hähnchen verschlossen; es ist also hierbei darauf zu achten, daß die zu messende Flüssigkeit auch das gebogene Röhrchen vollständig ausfüllen muß. Hat man nun die Elektrode in ihre Metallklemme am Gestell verbracht, so wird bei *sehr reichlich strömendem* Wasserstoff das Gummiverbindungsstück des *Kipp*schen Apparats an das freie Ende des U-förmigen Röhrchens angesteckt und nunmehr das Gas in der oben bereits beschriebenen Weise eingeleitet, wobei aber in diesem Falle der Liquor aus dem gebogenen Röhrchen zunächst in das Elektrodengefäß durch den Wasserstoff hineingedrückt wird. Dadurch, daß hierbei einerseits das gebogene Röhrchen mit dem Hähnchen liquorhaltig ist und andererseits dem Gummiverbindungsstück im Augenblick des Anschaltens an das freie Ende des gebogenen Röhrchens *sehr reichlicher* Wasserstoff entströmt, wird vermieden, daß sich im Moment des Schlauchanschlusses Luft beimischt.

Ein nennenswerter CO_2-Verlust ist während des Aufsteigens des Liquors im Elektrodengefäß in den wenigen in Frage kommenden Augenblicken nicht zu erwarten, da ja der Stopfen sofort dicht aufgesetzt wird. Allenfalls kann man vor dem Einlassen des Liquors in das Elektrodengefäß von oben her einige Tropfen Paraffinum liquidum einpipettieren, durch welche der aufsteigende Liquor von der Berührung mit der Luft abgehalten wird, man muß dann darauf achten, daß der Stopfen erst dann in das Elektrodengefäß eingesetzt wird, nachdem das Paraffinum liquidum durch die emporsteigende Liquorsäule aus dem Elektrodengefäß herausgedrängt worden ist. Im übrigen kommt eine vorübergehende Berührung mit der Außenluft nur noch am freien Ende des gebogenen und ziemlich englumigen Glasröhrchens in Frage, die man jedoch auf ein Minimum reduzieren kann, wenn man sofort an die Liquorentnahme die Wasserstoffeinleitung anschließt.

Die Handhabung ist also praktisch sehr einfach und sauber und zeichnet *sich vor allem auch dadurch aus, daß die kleine handliche, bequem transportable Elektrode unmittelbar am Krankenbett an die im Duralsack steckende Kanüle angeschlossen werden kann.* Will man Gummi als Verbindungsstück zwischen Punktionskanüle und Elektrode vermeiden, so wird sich zweifellos mittels einer Zweiwegekanüle auch ein Glasverbindungsstück mit dicht schließenden Schliffen an Punktionskanüle und Elektrode konstruieren lassen.

Meine mit dieser Elektrode gemessenen Werte des nativen Liquors ergaben p_H-Werte, welche zwischen 7,4 und 7,8 lagen. Im Eisschrank in mit Wattebausch in üblicher Weise verschlossenen Röhrchen aufbewahrt, ergaben dieselben Liquors bereits am nächsten Tage einen um etwa 0,3 größeren Exponenten und am übernächsten Tage fast regelmäßig einen p_H von 8,0 bis 8,5. Meine Werte, die ich an Liquors verschiedener nosologischer Provenienz sowohl wie an Normalliquor gewonnen habe und die in dieser Mitteilung nur als summarische Durchschnittswerte aufzufassen

sind, decken sich annähernd mit denen von *Yllpö*, *Bisgaard*, *Sahlgren* (kolorimetrisch), *Brock* (kolorimetrisch), *Waltner*, *Behrendt*, *Meier*, *Pearson*, *Shearer*. Alle höheren Werte, wie z. B. die von *Polany* (p_H 10,0), *Presser* und *Weintraub* (p_H 8,7 als Normalwert) sind wohl zweifellos ohne genügende Berücksichtigung des CO_2-Verlustes des Liquors vor oder während der Messung gewonnen worden.

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß es sich empfiehlt, die Platinelektrode nicht länger als 3 bis 4 mm zu halten, damit die Wasserstoffblase nicht zu groß wird im Verhältnis zur Flüssigkeitsmenge der Elektrode. Denn je höher die Flüssigkeitssäule und je kleiner die Gasblase, um so geringer der Messungsfehler, welcher dadurch entsteht, daß bei dem Eintreten des Kohlensäuregleichgewichts ein minimaler Teil der in der Flüssigkeit enthaltenen Kohlensäure in die Gasblase übergeht.

Die Elektrode wird geliefert von der Firma Robert Götze, Leipzig, Glasinstrumente, Nürnbergerstraße 56.

Literatur.

1) *Behrendt*, diese Zeitschr. **144**, H. 1/2, 1924. — 2) *Bisgaard*, ebendaselbst **58**, 1, 1914. — 3) *Brock*, ebendaselbst **140**, 591, 1923. — 4) *Hasselbalch*, ebendaselbst **30**, 1910/11; **78**, 112, 1917. — 5) *Meier*, ebendaselbst **124**, 137, 1921. — 6) *Michaelis* und *Rona*, ebendaselbst **18**, 317, 1909. — 7) *Pearsons* und *Shearer*, Journ. of physiol. **54**, 62, 1920. — 8) *Presser* und *Weintraub*, Zeitschr. f. Immun. u. exper. Therap. **33**, 317, 1922; **36**, 34, 1923. — 9) *Sahlgren*, Münch. med. Wochenschr. **69**, 618, 1922. — 10) *Waltner*, diese Zeitschr. **149**, 145, 1924.

Über Bedingungen der autolytischen Ammoniakbildung in den Geweben.

Von

Georg Popoviciu (Cluj).

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 8. Februar 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die Ammoniakbildung ist ein Gewebsprozeß, der nach früherer Auffassung lediglich in der Leber stattfinden sollte [*Nencki-Pawlow*[1])].

Die Versuche *Nash* und *Benedicts*[2]) wiesen aber schon auf die Niere hin und nach neueren Untersuchungen *Warburgs*[3]), *Meyerhofs*[4]) und *Grafes*[5]) entsteht Ammoniak in allen Organen. Diese Befunde sind für die weitere Forschung über die Bedingungen, unter denen Ammoniak im Organismus gebildet bzw. ausgeschieden werden kann, von grundlegender Bedeutung. Über die im Organismus entstandene Ammoniakmenge und dessen Rolle im Stoffwechsel werden aus der Gesamtsäureausscheidung im Urin Schlüsse gezogen [*György*[6])]. Die Gesamtsäureausscheidung wird durch das Verhältnis von zwei Faktoren bestimmt: das im Urin ausgeschiedene Ammoniak und die titrierbare Acidität, die hauptsächlich durch die Phosphatsalze getragen wird. Nun haben sich für die Entstehung der Phosphate durch die jüngsten Versuche *Györgys*[7]), der ihre Bildung in den Nierenzellen [vgl. auch *Eichholz*[8])] sowie in allen anderen Organen bewies, gut faßbare Bedingungen feststellen lassen.

---

[1]) Siehe einschlägige Literatur bei *Nash* und *Benedict* und bei *Parnas* und *Heller*.

[2]) *Nash* und *Benedict*, Journ. of biol. Chem. **48**, 463, 1921.

[3]) *Warburg*, *Posener* und *Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

[4]) *Meyerhof*, *Lohmann* und *Meier*, ebendaselbst **157**, 459, 1925; *Meyerhof*, Klin. Wochenschr. 1925, S. 341.

[5]) *Grafe*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 16, S. 640.

[6]) *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **99**, 109, 1922; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **43**, 605, 1924.

[7]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **161**, 157, 1925.

[8]) *Eichholz*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 41, S. 1919.

Es war anzunehmen, daß ähnliche Bedingungen auch bei der Entstehung des Ammoniaks eine Rolle spielen würden, und es war ferner zu erwarten, daß die bei der autolytischen Phosphatbildung angewandte (oder eine analoge) Versuchsanordnung Einblicke auch in die Bedingungen der Ammoniakbildung gestatten würde. Da die Entstehung des Ammoniaks als omnicellulär betrachtet werden muß, kann man schon aus der Einbeziehung eines Gewebes in die Versuche zu Resultaten kommen, die nicht nur für die Bildung des Ammoniaks in diesem einen Gewebe, sondern auch für die Entstehung in sämtlichen anderen Organen wichtig sind.

Methodik.

Wir prüften hauptsächlich die Ammoniakbildung in einem Gewebsbrei, den wir aus lebenswarm bezogener Schweineleber jeweils frisch herstellten. Dem Breie (je 1 g) wurden je 3 bis 5 ccm Lösungen derjenigen Substanzen, deren Wirkung auf die Ammoniakbildung untersucht werden sollte, zugesetzt. Es wurde auf möglichste Verhütung von Bakterienbeimengung und Wachstum während des Aufbewahrens der Proben, auf Sterilität geachtet, zu welchem Zwecke die Proben auch mit einigen Tropfen Chloroform versetzt wurden. Der Ammoniakgehalt wurde aus je 1 ccm der Flüssigkeit bestimmt und auf 100 g Gewebe umgerechnet. Die erste Bestimmung erfolgte gleich nach Zusatz der fraglichen Salz- oder Zuckerlösung zum Gewebsbrei und nach Zentrifugieren der Mischung. Die nächsten Proben waren vor der Bestimmung auf $\frac{1}{2}$ bis 24 Stunden, oder sogar länger im Brutschrank (bei 37° C) aufbewahrt. Außer Schweineleber wurden in vereinzelten Versuchen auch Kalbsleber, Schweine- und Kalbsmilz sowie Rattenmuskel geprüft.

Zur Bestimmung des Ammoniakgehalts der Gewebsflüssigkeit benutzten wir die *Parnas-Wagner*sche Methode[1]). Um die Werte zweier, mit verschiedenen Lösungen (Salze, Zucker) versetzten Proben genauer vergleichen zu können, wurden Bestimmungen gleichzeitig an zwei Apparaten ausgeführt. Die zwei Apparate waren an dieselbe Wasserstrahlpumpe als Vakuumsystem angeschlossen. Dabei schien das Einklammern der Apparate (am Destillierkolben, Stelle der Silberdrahtspirale, am Vorlagerohr und am Rückflußrohr) sicheres Arbeiten besser zu ermöglichen und zugleich auch die Vermeidung von Brüchen zu gewährleisten.

Allerdings ist das gleichzeitige Arbeiten mit zwei Apparaten nicht leicht und verlangt ein gutes Vakuum und entsprechende Dampfbildung. Dazu kommen die Schwierigkeiten, die das Schäumen, besonders der mit Phosphatlösungen versetzten Gewebsflüssigkeit verursacht. In solchen Fällen und auch bei Proben, die viel Ammoniak enthalten, kann man auch nur 0,5 ccm der zu bestimmenden Flüssigkeit verarbeiten.

Die über 24 Stunden im Brutschrank gelassenen Proben zeigen besonders in sauren Phosphatlösungen einen meist sehr hohen Ammoniakgehalt, wie es unten noch auseinandergesetzt werden wird. Die Austreibung

---

[1]) In ihrer neuesten Modifikation. Siehe *Parnas* und *Wagner*, diese Zeitschr. **125**, 253, 1921; *Parnas* und *Heller*, ebendaselbst **152**, 1, 1924; *Parnas*, ebendaselbst **155**, 247, 1924; *Parnas* und *Taubenhaus*, ebendaselbst **159**, 298, 1925.

und das Auffangen solcher Ammoniakmengen benötigt eine längere, auch weit mehr als 10 Minuten dauernde und vier- bis sechsmal zu wiederholende Destillation, wobei bis auf 100 ccm Flüssigkeit gewonnen werden. Deshalb benutzten wir größere Vorlageröhren, als es *Parnas* für die Blutbestimmungen angibt, wo man mit höchstens drei Destillationen und mit 4 bis 5 ccm Flüssigkeit pro Destillat auskommt.

Zu solchen größeren Mengen Ammoniak werden bis 3 ccm (oder sogar mehr) Nesslerreagens verbraucht. Nur ist da auf eine entsprechende Verdünnung *vor* Zusatz des Reagens zu achten, sonst entsteht ein Präzipitat, das eine Trübung der Flüssigkeit verursacht. Eine Trübung kann man auch bei kleinen Mengen Ammoniak erhalten, wenn die Lösung vor dem Zusetzen des Reagens nicht genügend abgekühlt war. Solche Farben sind selbstverständlich zu den kolorimetrischen Bestimmungen nicht zu verwenden.

Zwecks Alkalisierung der Gewebsflüssigkeit gebrauchten wir die von *Parnas* angegebene stärkere Boratlösung, die man durch das Auflösen von 12,4 g Borsäure (*Kahlbaum*) in 110 ccm n/1 NaOH erhält und die ein p_H von 9,2 besitzt[1]). Bei sauren Lösungen mußte man zuweilen größere Mengen (3 ccm) Boratlösung gebrauchen. Wir kontrollierten die Alkalinität solcher Proben mit Phenolphthalein, dessen Entfärbung im Destillierkolben die Abnahme der notwendigen Alkalinität angibt. Solche Entfärbungen kommen öfters auch während der Destillation vor, als Folge der durch die Entfernung des Ammoniaks auftretenden Alkalinitätsabnahme. Da sich durch nochmalige Destillation solcher, während der Verarbeitung entfärbter Lösungen nach Zusatz neuer Boratlösungen kein weiteres Ammoniak mehr nachweisen ließ, glauben wir, daß die Entfärbung der Lösung während des Destillationsprozesses in diesen Fällen keine Fehlerquelle bedeutet. Ammoniumsulfatzusätze nach *Parnas*[1]), als Kontrollprüfungen angewandt, zeigten immer eine vollständige Austreibung des Ammoniaks an.

Versuche[2]).

In unseren Versuchen prüften wir die Ammoniakbildung bei Gegenwart von Phosphaten und Lactaten und bei wechselnden p_H-Werten sowie bei Dextrose-, Ca-, K-, Na-Ionenzusatz und bei Hypotonie (Verdünnung mit destilliertem Wasser).

Einen Zusammenhang zwischen Wasserstoffionenkonzentration und Ammoniakbildung stellten *Parnas* und *Heller* (l. c.) bei Boratpuffern im Blute fest und fanden, daß mit Zunahme der Alkalinität geringere Mengen von Ammoniak entstehen. Doch legen diese Resultate vorläufig die Abhängigkeit der Ammoniakbildung von dem p_H nur annähernd fest. Auch nimmt im Blute die Ammoniakentstehung bei Verschiebung der Reaktion gegen die alkalische Seite anfangs vorübergehend noch zu.

Im Hinblick auf die schon erwähnten, wichtigen Beziehungen zwischen Harnphosphaten und Harnammoniak lag es nahe, vor allem einerseits den Einfluß der Phosphate überhaupt, andererseits ihre Wirkung bei verschiedenen H-Ionenkonzentrationen auf die autolytische Ammoniakbildung der Gewebe zu prüfen.

[1]) l. c., S. 2.

[2]) Die Versuche wurden auf Veranlassung von Herrn Priv.-Doz. Dr. *György* ausgeführt und durch die reichliche Hilfe der Rockefeller-Foundation ermöglicht.

Unsere in diesem Sinne ausgeführten Analysen stellten eine Zunahme der Ammoniakbildung mit steigender H-Ionenkonzentration fest. Bei p_H 8,4 kann die Ammoniakbildung, nach einer vorherigen kurzen Zunahme fast vollständig aufgehoben werden (Abb. 1). Diese vorherige Zunahme

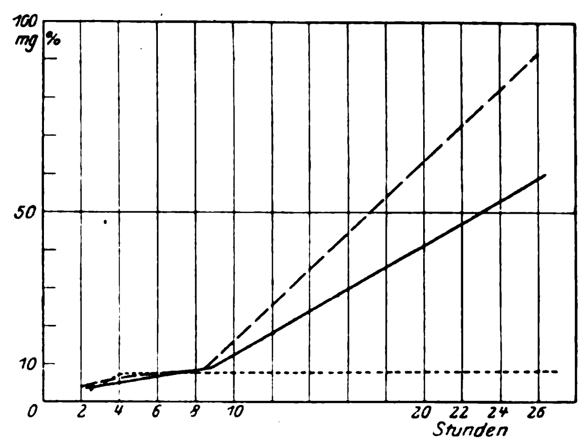


Abb. 1. Ammoniakbildung im Schweineleberbrei
bei ----- Phosphatgemisch p_H 6,1 (n/2),
„ ——— „ p_H 6,9 (n/2),
„ .... „ p_H 8,4 (n/2).

ist auch bei weniger alkalischen, neutralen oder sauren Phosphatlösungen wahrnehmbar und scheint mit der Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration gegen die saure Seite hin abzunehmen. Ob dieses in den ersten Stunden wahrnehmbare Verhalten der Ammoniakbildung, das — im Falle der alkalischen Lösungen — gewissermaßen konträr dem Endresultat verläuft, eine besondere Phase bedeutet, ist aus unseren Versuchen mit Sicherheit nicht festzustellen. Es fehlt nicht an Reihen, wo es vollständig ausblieb. Noch weniger genau präzisierbar sind die anfänglichen Ammoniakwertunterschiede, die wieder mehr den Endresultaten ähnlich zu verlaufen scheinen. Es sind dies Punkte, die noch genauerer Prüfung bedürfen.

In den Analysen, wo wir die Ammoniakbildung über 24 Stunden prüften, fanden wir keine bemerkenswerten weiteren Abweichungen.

Die primären und sekundären Phosphatstammlösungen, die wir zur Herstellung unserer Pufferlösungen gebrauchten, waren n/1 bis n/2 Lösungen. Ob ein Unterschied bei diesen zwei Konzentrationen, die Ammoniakbildung betreffend, vorhanden sein kann, entscheiden unsere nur wenig zahlreichen Versuche nicht mit Sicherheit, trotzdem eher eine Abnahme der Ammoniakwerte bei Verdünnung der Lösungen feststellbar ist. Gleichfalls konnte — mangels genügender Versuchszahl — kein sicher charakteristischer Unterschied zwischen Schweine-, Kalbsleber und Milz bestimmt werden, jedoch scheint die Ammoniakbildung in den letzteren wieder geringer zu sein, was ja durch die von *Parnas*[1]) beobachteten Unterschiede dieser Tiersorten und vielleicht mit dem Blutkörperchenreichtum der Milz zu erklären wäre.

---

[1]) l. c., S. 2.

Um nun die Bildungsweise des Ammoniaks unter Einfluß der Phosphate und der verschiedenen H-Ionenkonzentrationen klären zu können, wurde die autolytische Ammoniakbildung in n/1 bis n/2 Lactatpufferlösungen bei einer p_H-Breite von 4,3 bis über 8,4 geprüft. Da ergab sich der merkwürdige Befund, daß mit *Zunahme der Alkalinität die Ammoniakbildung*

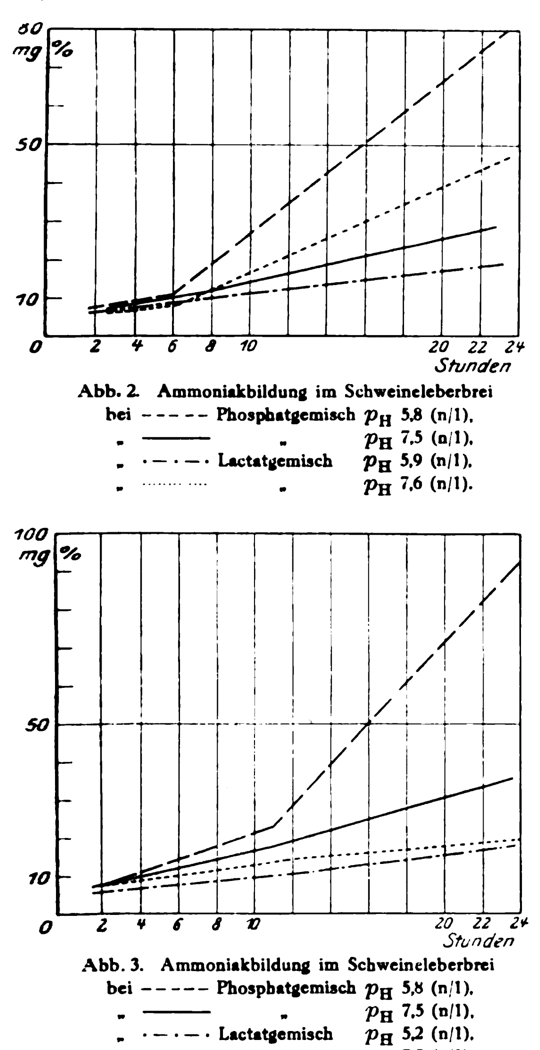


Abb. 2. Ammoniakbildung im Schweineleberbrei
bei - - - - - Phosphatgemisch p_H 5,8 (n/1),
„ ——— „ p_H 7,5 (n/1),
„ · — · — · Lactatgemisch p_H 5,9 (n/1),
„ ·········· „ p_H 7,6 (n/1).

Abb. 3. Ammoniakbildung im Schweineleberbrei
bei - - - - - Phosphatgemisch p_H 5,8 (n/1),
„ ——— „ p_H 7,5 (n/1),
„ · — · — · Lactatgemisch p_H 5,2 (n/1),
„ ·········· „ p_H 7,5 (n/1).

größer wurde. Dabei ist hier die Ammoniakbildung im Vergleich mit der bei den Phosphaten im allgemeinen, auch beim neutralen Punkte, verringert und erreicht auch bei starker Alkalinität des Lactatpuffers die Höhe des bei sauren Phosphaten beobachteten Ammoniakquantums nicht (Abb. 2 und 3). Was die Anfangsphasen betrifft, so gilt auch da das bei den Phosphaten

Beobachtete. Der Verlauf scheint sich, wie dort, öfters wellenartig zu gestalten, bis zum Erreichen der Endresultate, die besonders nach 24 Stunden markante und dann konstant bleibende Unterschiede aufweisen. Es ist zu betonen, daß die Reaktion der Lactatpufferlösungen viel geringer stabil ist und besonders im Kontakt mit dem Gewebsbrei sich rasch gegen die saure Seite verschiebt (in 24 Stunden von p_H 7,6 auf 5,8, von 6,8 auf 5,5). Dagegen sind die Phosphatpuffer viel beständiger. Der Einfluß der Verdünnung und die Variationen nach Tierarten sind wegen geringer Zahl der Analysen auch hier nur mit Reserve feststellbar, scheinen aber das bei den Phosphaten wahrscheinlich Gemachte ebenfalls zu bestätigen.

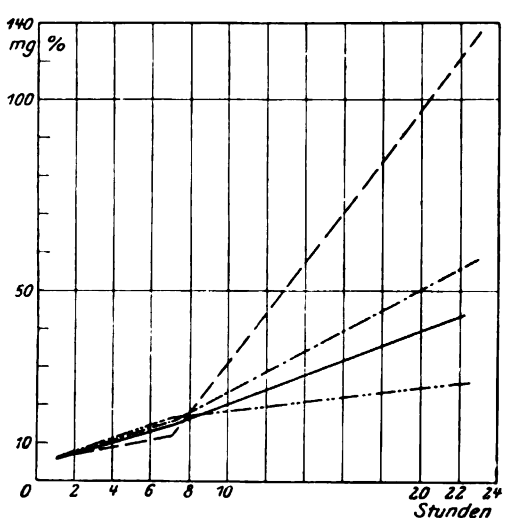


Abb. 4. Ammoniakbildung im Schweineleberbrei
bei ----- Phosphatgemisch p_H 5,8 (n/1),
" ——— " p_H 7,5
" ·—·—· " p_H 5,8 + 2 Proz. Dextrose,
" ··—··—·· " p_H 7,5 + 2 " "

Das paradoxe Verhalten der Lactatpuffer ergab die Notwendigkeit einer Weiterprüfung der Ammoniakbildung unter Wirkung von milchsäurebildenden Substanzen. Es kam vor allem Dextrose in Betracht. Den Phosphatpuffern in 1- bis 2proz. Lösung zugesetzt, verhindert sie die Ammoniakbildung, besonders im Beisein der sauren Phosphate (Abb. 4 und 5). Dabei nimmt die Alkalinität der mit dem Gewebsbrei in Kontakt stehenden Phosphatpufferlösungen im Gegensatz zu den zuckerfreien stark ab (nach 24 Stunden von p_H 7,5 auf 6,3, bei den sauren Lösungen von 6,1 auf 4,3), was für Milchsäurebildung spricht. Die Vorphasen in den ersten Stunden scheinen ähnlich wie bei den Phosphatpufferversuchen zu verlaufen, zunächst eine Abnahme der Ammoniakbildung bei Zuckerzusatz, wie es *Warburg* (l. c.) angibt, dann ein Umkehren der Wirkung vor der endgültigen starken Verringerung.

Das Bild wird durch Versuche, die in Ca-, K- oder Na-reichem Milieu ausgeführt wurden (1proz. $CaCl_2$, KCl oder 0,9proz. NaCl), sowie diejenigen, die durch Zufügung von destilliertem Wasser die Wirkung (der physiologisch wichtigsten Kationen und die) der Verdünnung zu erörtern bezweckten,

ergänzt. Auch hier scheint die Ammoniakbildung öfters mehrphasig zu verlaufen und kommt es schließlich — aber auch ohne Vorphasen — zu endgültigen Unterschieden, wobei das Ca eine Verhinderung der Ammoniakbildung, im Vergleich zum K, oder manchmal besonders zum Na bewirkt. Die Unterschiede bei den Kationen sind wenig ausgesprochen. Unsere Versuche, die Unterschiede besser durch Phosphatpuffer + Ca bzw. K und Na erscheinen zu lassen, haben zu keinen nennenswerten Erfolgen geführt. Zusatz von Aqua dest. zum Gewebsbrei *verhindert* aber deutlich die Ammoniakentstehung.

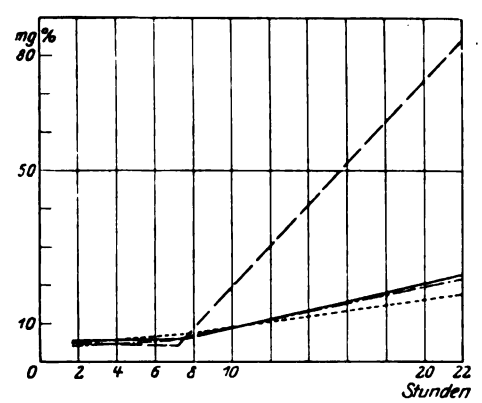


Abb. 5. Ammoniakbildung im Schweineleberbrei
bei ----- Phosphatgemisch p_H 5,8 (n/1),
„ ——— „ p_H 7,5
„ ·—·—· „ p_H 5,8 + 2 Proz. Dextrose,
„ .... „ p_H 7,5 + 2 „ „

Besprechung der Ergebnisse.

Unsere Ergebnisse sind in gutem Einklang mit einem großen Teile früherer Untersuchungen, die das Entstehen des Ammoniaks im Organismus und die bei dieser Bildung wirksamen Faktoren prüften.

Vor allem scheinen die Befunde, welche die Abhängigkeit der Ammoniakbildung von den Phosphaten deutlich machen, von grundsätzlicher Bedeutung zu sein. Die Phosphate würden danach die Ammoniakbildung beschleunigen. Dazu gehört allerdings auch eine günstige Wasserstoffionenkonzentration. Die Abnahme derselben drückt die Ammoniakbildung herunter. Der Rückgang bei alkalischen Phosphaten könnte, wenigstens teilweise, auch als ein scheinbarer aufgefaßt werden, wobei die Ammoniakbildung durch sofortige Bindung desselben in Form von Magnesiumammoniumphosphat verdeckt werden würde. Doch konnten wir durch Zufügung von n/10 HCl kein wesentliches Freiwerden von Ammoniak nachweisen.

Gegen eine alleinige Bedeutung der H-Ionenkonzentration für das Entstehen des Ammoniaks, die übrigens auch aus den *Parnas*schen Versuchen nicht ohne weiteres hervorgeht, spricht das Verhalten in

Lactatpuffern. Die von uns beobachtete Förderung durch alkalische Lactatpufferlösungen und Verhinderung in den sauren, macht eine indirekte Wirkung des Lactations wahrscheinlich. Dasselbe verhindert die autolytische Bildung der anorganischen Phosphate [*György*[1])] und dadurch erst sekundär das Entstehen des Ammoniaks. Die Phosphathemmung tritt nach Versuchen *Györgys* erst in konzentrierteren Lactatlösungen ein, infolgedessen muß auch die Ammoniakbildung in sauren Lactatlösungen geringer sein, als in den alkalischen wie wir es auch gefunden haben.

Nach solcher Auffassung würden bei der Ammoniakbildung die Phosphate die Hauptrolle spielen. Andere Ionen usw. wirken indirekt durch die Phosphate, indem sie die Entstehung der letzteren verhindern oder fördern. So könnte auch die Wirkung der Dextrose — wenigstens teilweise — eine indirekte sein. Zwei Momente kommen für den Dextroseeinfluß in Betracht: Erstens bindet Dextrose die Phosphate [*György*[2]), *Harrop* und *Benedict*[3])]. Andererseits sprechen die Veränderungen der H-Ionenkonzentration des mit Phosphatpuffer + Dextrose versetzten Gewebebreies für eine Milchsäureentstehung aus der Dextrose, wie es übrigens erwartet werden kann, und Milchsäure hemmt die Ammoniakbildung, wie wir oben nachweisen konnten. Bei Dextrose wird also die Wirkung der Phosphate auf die Entstehung des Ammoniaks auf zwei Wegen im hindernden Sinne beeinflußt. Diese Erklärung könnte die schon von *Warburg* gegebene noch ergänzen.

Die bei Verdünnung, d. h. bei einer Erniedrigung des osmotischen Druckes beobachtete Hemmung der Ammoniakbildung ist mit den *Parnas*schen Befunden in Einklang. In den Versuchen *Györgys* begünstigt Hyperosmose die Phosphatentstehung und umgekehrt, woraus sich wieder ein indirekter Einfluß der Phosphate auf die Ammoniakbildung ergeben könnte. Infolge ihrer geringeren Entstehung im hyposmotischen Milieu mußte weniger Ammoniak gebildet werden, was auch bei uns der Fall ist. In Analogie zu der von *György*[4]) beobachteten ersten erniedrigten Phase bei Hyperosmose, konnten wir bei der Verdünnung öfters eine anfängliche Zunahme der Ammoniakbildung beobachten.

Aus unseren Versuchen, betreffend den Zusammenhang der Ammoniakbildung mit dem Phosphat- oder Lactatmilieu ergeben sich Schlußfolgerungen, die völlig mit den von *Warburg* und *Meyerhof* erzielten Resultaten übereinstimmen. So findet *Warburg*[5]) die

---

[1]) l. c., S. 1 (7).
[2]) *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. **98**, 245, 1922.
[3]) *Harrop* und *Benedict*, Journ. of biol. Chem. **59**, 683, 1924.
[4]) l. c., S. 1 (7).
[5]) l. c.

Ammoniakbildung unter aeroben Bedingungen erhöht, bei anaeroben (Milchsäurebildung) dagegen erniedrigt. Die Wirkung der Phosphate muß als eine oxydationsfördernde aufgefaßt werden [*Meyerhof*[1]) *Thunberg*[2]), *György*[3])], dementsprechend fanden auch wir die stärkste Ammoniakbildung in Phosphatlösungen. Ganz unseren Resultaten entsprechend, sieht auch *Meyerhof* die Ammoniakbildung bei Milchsäurezusatz vermindert[4]).

Die Ca-, K- und Na-Wirkung auf die Entstehung des Ammoniaks könnte wiederum als eine indirekte, bedingt durch Verhinderung oder Förderung der Phosphatbildung aufgefaßt werden [*György*[5])]. Diese Erklärung ist auch mit dem Einfluß dieser Ionen auf die Atmung [*Warburg*[6]), *Moro-Klocmann*[7]), *György*[8]), *Ellinger*[9]), *Lange*[10])] in Einklang und berücksichtigt die oben angeführten Bedingungen der Ammoniakbildung völlig.

Andererseits sprechen unsere Versuche, da sie ähnliche Bedingungen für die Entstehung des Ammoniaks in Leber, Muskel und Milz beweisen, für die *omnicelluläre* Ammoniakbildung. Unter dieser Voraussetzung und bei Berücksichtigung von den durch unsere Versuche festgestellten Bedingungen erscheint es erlaubt, die Ammoniakausscheidung am Beispiel der Überventilationstetanie einer näheren Analyse zu unterziehen. So konnten *Brehme* und *Verfasser* in Überventilationsversuchen während des Krampfstadiums, und zwar sowohl bei sehr ausgeprägten Krämpfen (nach Adrenalin), wie in den kaum angedeuteten (nach Ergotamin), eine Erhöhung der Milchsäurewerte im Blute nachweisen. Diese Zunahme des Milchsäuregehalts müßte nach den Versuchen von *György*[11]) eine Verminderung der Phosphorabspaltung verursachen. In der Tat ist ein niedriger Serum-P-Gehalt und eine verminderte Phosphatausscheidung im Urin bei der Überventilationstetanie nachgewiesen worden [*György* und *Vollmer*[12]), *Haldane*[13]), *Gollwitzer-Meier*[14])]. Die Abnahme der Phosphate muß wiederum eine

---

1) *Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 1 und 185, 1918.
2) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **25**, 37, 1911.
3) *György*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 4, S. 172; siehe auch l. c., S. 9 (2).
4) l. c., S. 1 (4).
5) l. c., S. 1 (7).
6) *Warburg*, Ergebn. d. Physiol. **14**, 253.
7) *Moro-Klocmann*, Jahrb. f. Kinderheilk. **79**, 676, 1914.
8) l. c., S. 10 (5).
9) *Ellinger*, Zeitschr. f. d. ges. physiol. Chem. **116**, 266, 1921.
10) *Lange*, ebendaselbst **137**, 105, 1924.
11) l. c., S. 1 (7).
12) *György* und *Vollmer*, diese Zeitschr. **140**, 391, 1923.
13) *Haldane*, *Wigglesworth* und *Woodrow*, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B., **96**, 1, 1924.
14) *Gollwitzer-Meier*, diese Zeitschr. **160**, 433, 1925.

kleinere Menge entstandenen Ammoniaks bedingen und infolgedessen eine Verminderung des im Urin ausgeschiedenen Ammoniaks zustande bringen, was auch der Fall ist [*György*[1])].

Tabelle I (Versuch 18).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Phosphatgemisch	p_H 6,1	45′	4,1	5h30′	5,7	22h50′	40,0
	p_H 6,9	60	3,9	5 45	6,66	23 20	14,4
	p_H 8,4	1h10	4,8	6 45	7,2	23 40	9,8

Tabelle II (Versuch 19).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Phosphatgemisch	p_H 6,1	2h	4,0	4h	6,8	8h20′	8,89	26h	91,2
	p_H 6,9	2 15′	3,5	4 10′	5,4	8 40	9,6	26 10′	60,0
	p_H 8,4	2 30	3,9	4 20	7,1	9	8,0	27	8,2

Tabelle III (Versuch 16).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Phosphatgem.	p_H 6,1	40′	3,8	5h10′	3,56	7h40′	8,0	12h25′	13,6	31h40′	42,46
	p_H 6,9	40	5,0	3 50	7,04	8 10	15,0	13 20	18,58	32 10	25,6
	p_H 8,4	55	4,0	4 20	4,0	8 40	11,2	12 40	15,21	32 40	12,0

Tabelle IV (Versuch 38).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/1 Phosphatgemisch	p_H 5,8	45′	7,0	6h45′	11,2	24h15′	115,36	36h30′	176,0
	p_H 7,5	1h15	5,6	7 15	14,0	26 45	31,12	27 30	68,66

[1]) l. c., S. 1 (6).

Tabelle V
(Versuch 17).

Je 1 g Kalbsleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Phosphatgemisch	p_H 6,1	25′	1,8	1h30′	2,66	2h45′	4,0	10h30′	8,89
	p_H 8,4	45	1,44	3 30	4,8	3 45	6,24	11	6,66

Tabelle VI.
(Versuch 14).

Je 1 g Kalbsmilz + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Phophatgemisch	p_H 6,9	1h30′	4,0	6h	6,4	11h45′	11,4
	p_H 7,5	1 30	4,0	6 20′	6,4	12	9,6
	p_H 8,4	1 45	4,0	6 40	5,12	11 30	9,6

Tabelle VII
(Versuch 27).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Lactatgemisch	p_H 5,2	1h20′	2,5	6h35′	4,11	26h35′	12,0	40h35	16,0
	p_H 6,5	1 20	2,66	6 50	4,0	27 05	16,0	41 05	44,36
	p_H 7,5	1 35	3,6	6 50	3,73	26 35	17,5	40 35	48,0

Tabelle VIII
(Versuch 27).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Lactatgemisch	p_H 4,9	1h25′	4,5	22h40′	13,33	32h40′	30,4
	p_H 5,8	1 25	4,0	22 40	16,5	32 40	47,2
	p_H 7,5	2	3,6	23 10	17,68	33 10	80,0

Tabelle IX

(Versuch 25).

Je 1 g Kalbsleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/1 Lactatgem.	p_H 4,8	40′	3,6	2h30′	4,5	6h35′	4,53	24h20′	9,6
	p_H 5,5	40	3,46	2 30	4,0	6 35	5,86	24 50	12,0
	p_H 7,7	1h05	3,33	3 05	4,4	7 05	4,65	24 20	12,6

Tabelle X

(Versuch 21).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/2 Lactatgem.	p_H 4,3	2h30′	6,8	3h25′	6,75	6h30′	6,8	23h	7,2
	p_H 6,0	2	7,5	3	8,9	6 45	8,9	23	21,4
	p_H 8,4	3	7,0	3 50	7,0	6 35	7,2	24	30,0

Tabelle XI

(Versuch 24).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 …
n/1 Lactatgemisch	p_H 7,0	1h15′	7,2	2h30′	6,0	7h	9,04	23h	16,65	28h30′	[illegible]
n/1 Phosphatgemisch	p_H 6,9	1 15	8,0	2 30	7,5	7	8,8	23	30,0	29 30	[illegible]

Tabelle XII

(Versuch 23).

Je 1 g Kalbsleber + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 …
n/2 Lactatgemisch p_H 6,8	3h50′	2,95	4h35′	4,0	7h05′	5,6	22h30′	17,5	24h	17,0	29h45′	[illegible]
n/2 Phosphatgemisch p_H 6,9	3 50	3,6	4 35	4,8	7 05	·5,5	22 30	12,8	24	18,0	29 45	[illegible]

Tabelle XIII
(Versuch 28).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/1 Lactatgemisch	p_H 5,2	1h30′	5,6	10h45′	10,0	23h45′	18,2
	p_H 7,5	2	7,2	11 30	14,13	24 00	20,0
n/1 Phosphatgemisch	p_H 5,8	2	7,4	11	22,8	24 00	92,8
	p_H 7,5	1 30	7,2	10 45	17,8	23 45	36,0

Tabelle XIV
(Versuch 40).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/1 Lactatgemisch	p_H 5,9	1h50′	6,0	6h30′	9,6	23h15′	19,4	37h	134,2
	p_H 7,6	2 30	6,66	6 15	8,4	22 45	47,27	37	186,0
n/1 Phosphatgemisch	p_H 5,8	1 50	7,2	6	10,8	23 15	80,0	35 30′	279,2
	p_H 7,5	2 30	7,11	7	10,4	22 45	29,67	35 30	221,2

Tabelle XV
(Versuch 29).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/1 Phosphatgem.	p_H 5,8 + 2 Proz. Dextrose	50′	4,0	6h15′	5,13	22h30′	40,0
	p_H 7,5 + 2 " "	1h30	3,56	5 30	7,2	23	14,0
	p_H 5,8 ohne "	50	6,0	5 30	5,13	22	66,66
	p_H 7,5 " "	1 45	5,33	7	9,0	22	22,23

Tabelle XVI
(Versuch 30).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm		Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
n/1 Phosphatgem.	p_H 5,8 + 2 Proz. Dextrose	1h50′	4,8	6h30′	6,0	22h20′	21,12
	p_H 7,5 + 2 " "	1 50	5,3	6 30	6,66	22	17,6
	p_H 5,8 ohne "	1 30	5,2	7 10	4,8	21 55	83,0
	p_H 7,5 " "	1 30	5,71	7 10	6,0	21 55	22,93

Tabelle XVII (Versuch 39).

	Je 1 g Schweineleber + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3
n/1 Phosphatgm.	p_H 5,8 + 2 Proz. Dextrose	1h	5,86	7h 10′	16,53	23h	59,2	34h 20′	13
	p_H 7,5 + 2 „ „	1 15′	6,8	7 20	17,33	22 15′	25,71	31 30	10
	p_H 5,8 + ohne „	1 10	6,4	7 10	12,16	23	137,86	34 20	37
	p_H 7,5 + „ „	1 30	6,4	7 20	15,2	22 15	44,33	31 30	20

Tabelle XVIII (Versuch 3).

Je 1 g Rattenmuskel + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
0,9 proz. NaCl-Lösung	2h	7,2	3h	4,32	4h 30′	4,0	18h 30′	28,0
1 „ CaCl-Lösung	2	4,32	3	8,0	4 30	8,0	18 30	23,2

Tabelle XIX (Versuch 9).

Je 1 g Schweinemilz + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3
1 proz. KCl-Lös.	1h 10′	3,2	2h 30′	4,9	4h 45′	5,28	6h 15′	6,8	10h 45′	7,2	23h	2
1 „ CaCl-Lös.	1 20	3,84	2 45	6,0	4 15	8,8	6 45	9,0	11	9,6	22 45′	1

Tabelle XX (Versuch 13).

Je 1 g Kalbsleber + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3
1 proz. KCl-Lös.	2h	7,0	4h 30′	10,0	5h 45′	10,8	7h 40′	25,0	9h 30′	24,26	23h 45′	31
1 „ CaCl-Lös.	2 45′	8,0	5 15	10,2	6 45	11,0	8	21,73	9 15	19,73	24	28

Tabelle XXI (Versuch 31).

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
1,0 proz. $CaCl_2$-Lösung	1h 10′	2,66	6h 25′	3,56	28h 40′	44,0
1,0 „ KCl- „	1 10	2,84	6 25	4,0	28 40	52,4
0,9 „ NaCl-Lösung	1 30	3,2	6 10	3,73	29 40	54,8
0,9 „ H_2O	1 30	2,4	6 10	3,84	29 40	32,88

Tabelle XXII (Versuch 32)[1].

Je 1 g Schweineleber + 4 ccm	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe	Bestimmungszeit	mg-Proz. NH_3 pro 100 g Gewebe
1,0 proz. $CaCl_2$-Lösung	2h 20′	2,51	21h 50′	31,42	39h 20′	70,0
1,0 „ KCl- „	2 20	2,84	21 50	35,86	39 20	80,0
0,9 „ NaCl-Lösung	2 05	3,2	20 50	27,5	41 20	86,2
0,9 „ H_2O	2 05	2,26	20 50	15,6	41 20	51,0

Zusammenfassung.

1. Es wird die Wichtigkeit der anorganischen Phosphate für die autolytische Ammoniakbildung nachgewiesen. Bei dem Einfluß der Phosphate ist die Wasserstoffionenkonzentration gleichfalls von hervorragender Bedeutung. Die Entstehung des Ammoniaks nimmt mit der Alkalinität der Phosphatlösungen ab.

2. Lactate verhindern die Ammoniakbildung auf indirektem Wege, durch Hemmung der Phosphatabspaltung. Dadurch entsteht in alkalischen Lactatpuffern mehr Ammoniak als in den sauren.

3. Der Zusammenhang der Ca-, Na-, K-Ionen und der Verdünnung mit der Ammoniakbildung kann in ähnlicher Weise durch Einfluß auf die Phosphatabspaltung und Bildung erklärt werden.

4. Der Einfluß des Zuckers wird teilweise auch als Lactatwirkung aufgefaßt, teilweise im Sinne der Kohlenhydratphosphatbildung gedeutet.

[1]) Auf die Veröffentlichung einer größeren Anzahl von Versuchen, die dasselbe Resultat zeigen, wird verzichtet.

Über das Verhalten des Harnquotienten C:N beim Phlorrhizindiabetes des Hundes.

Von

Torao Kanamori (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. Februar 1926.)

Beim menschlichen Diabetes ist häufig, wie aus den Beobachtungen von *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (1) und von *Wada* (2) aus dem hiesigen Laboratorium hervorgeht, der Harnquotient C : N auch noch nach Abzug des gesamten Zucker- und Ketonkörperkohlenstoffs vom Gesamtkohlenstoff des Harns in abnormer Weise erhöht. Ja man findet auch gelegentlich dann eine Erhöhung des Quotienten C : N, wenn beim Diabetiker der Zucker und die Ketonkörper völlig aus dem Harn zeitweilig verschwunden sind.

Aus allen diesen Beobachtungen ergibt sich, daß beim menschlichen Diabetes vielfach, abgesehen vom Zucker- und Ketonkörper-C, nech andere C-reiche Verbindungen in pathologisch erhöhter Menge durch den Harn zur Ausscheidung gelangen. Hierin findet ebenfalls die beim menschlichen Diabetes vorliegende dysoxydative Störung ihren Ausdruck, die dysoxydative Störung, die hier vor allem ihren Sitz am Kohlehydrat hat. Daß neben dieser Herabsetzung der Oxydation beim menschlichen Diabetes an einer oder einzelnen Stoffquoten auch Oxydationssteigerungen hinsichtlich der Größe des Materialverbrauchs bei qualitativ normaler Durchführung der Oxydation an anderen Stoffquoten (Fett, Eiweiß) möglich sind, sei nur nebenbei bemerkt. Dadurch sinkt der respiratorische Quotient, und dadurch kann auch die Gesamtoxydation, gemessen am Gaswechsel, vergrößert werden.

Nach diesen Feststellungen beim menschlichen Diabetes erhob sich die Frage, wie sich der Harnquotient C : N beim Phlorrhizindiabetes verhält, ob sich aus der Gestaltung des Harnquotienten auch für den Phlorrhizindiabetes dysoxydative Störungen nachweisen lassen.

Beim Phlorrhizindiabetes walten folgende Verhältnisse ob. Wir folgen dabei der zusammenfassenden Darstellung, die *Grafe* (3) über die pathologische Physiologie des Phlorrhizindiabetes gibt, und verweisen auch hinsichtlich der Literatur zu diesem Gegenstande auf die *Grafe*sche Arbeit. Im Vordergrunde des gesamten Erscheinungskomplexes beim Phlorrhizindiabetes steht die enorme Zuckermobilisation, die durch die gewaltigen

Zuckerverluste hervorgerufen wird, die der Körper infolge des Durchlässigwerdens des Nierenfilters erleidet. Nur durch die Steigerung des Zuckernachströmens aus allen verfügbaren Quellen kann der Körper ungefähr den normalen Blutzuckerspiegel aufrecht erhalten; und der Blutzuckerspiegel bleibt bei der Phlorrhizinvergiftung auf ungefähr normaler Höhe. Beim Phlorrhizindiabetes besteht aber neben der Zuckermobilisation auch eine Oxydationshemmung in bezug auf den Zucker. Dieselbe ist zwar nicht vollständig, aber doch sehr weitgehend vorhanden. Darum sinkt der respiratorische Quotient auf den Fettwert von etwa 0,7, und darum wird zum Körper zugeführter Zucker, wenn es sich nicht um exzessiv große Mengen handelt, fast quantitativ wieder durch den Harn ausgeschieden, ohne den respiratorischen Quotienten zu erhöhen. Auch die Versuche in vitro, die *Gottschalk* (4) mitgeteilt hat, zeigen, daß Phlorrhizin die Zuckeroxydation hemmt. Beim Phlorrhizindiabetes ist aber die Gesamtoxydation gesteigert trotz der Oxydationshemmung am Kohlehydrat. Es wird vor allem Fett, aber auch im Hinblick auf die erhöhte N-Ausfuhr durch den Harn Eiweiß in vermehrter Menge umgesetzt. Der respiratorische Quotient sinkt deshalb. Diese quantitativ vermehrte Fett- und Eiweißverbrennung wird aber qualitativ in ungefähr normaler Weise durchgeführt. Dafür spricht die Erfahrung, daß die Acetonkörperausscheidung durch den Harn auch beim maximalen Phlorrhizindiabetes in der Regel nur gering ist. Man kann die beim Phlorrhizindiabetes auf Grund der bisherigen Untersuchungen vorhandenen Störungen nach alledem etwa folgendermaßen zusammenfassen: *Oxydationshemmung am Kohlehydrat, Oxydationssteigerung am Fett und Eiweiß neben der durch den Abfluß des Zuckers durch die Nieren bedingten Zuckermobilisation.*

Nun ist aber, wie oben schon erwähnt wurde, die Oxydationshemmung am Kohlehydrat keine absolute. Die in der *Grafe*schen Arbeit (3) mitgeteilten Versuche von *Gessler* über die teilweise Oxydation größerer, intravenös injizierter Zuckermengen beim Phlorrhizindiabetes des Hundes beweisen das besonders eindringlich.

So wäre es auch immerhin möglich, daß im Verlauf eines Phlorrhizindiabetes oder im Anschluß an einen solchen in der Nachperiode neben der Zuckerausscheidung durch den Harn oder nach abgeklungener Zuckerausscheidung noch mangelhaft oxydierte Abbauprodukte des Zuckers zur Ausscheidung durch den Harn gelangen, daß also unter gewissen Umständen Zucker noch abgebaut wird, aber nicht mehr in normaler, vollständiger Weise oxydiert wird, sondern bei seinem Abbau auf einer C-reichen Zwischenstufe stehen bleibt. Die gelegentlich auftretenden geringen Mengen von Acetonkörpern im Harn deuten vielleicht darauf hin, daß auch am Fett oder Eiweiß trotz der quantitativen Steigerung und bei im allgemeinen qualitativ gut durchgeführter Oxydation sich doch auch gewisse leichte dysoxydative Störungen bemerklich machen können. Auch auf diesem Wege könnte es zur Ausscheidung vermehrter Mengen von dysoxydablem C im Harn während eines oder im Anschluß an einen Phlorrhizindiabetes kommen.

Man darf ja nicht vergessen, daß das Phlorrhizin neben seiner eigentümlichen renalen Wirkung einen allgemeinen Zellreiz darstellt,

der zunächst die Zuckeroxydation schädigt und die Fett- und Eiweiß-oxydation anfacht. Bei dieser Erschütterung des gesamten Zellchemismus könnten natürlich auch am Eiweiß- und Fettumsatz dysoxydative Störungen unterlaufen. Ferner braucht die Phlorrhizinschädigung der Zelle mit dem Aufhören der Zuckerausscheidung durch den Harn keineswegs abgeklungen zu sein; Nachwirkungen liegen durchaus im Bereich der Möglichkeit; ja wir sehen, daß die vermehrte N-Ausscheidung durch den Harn und die Körpergewichtsabnahme die Zuckerausscheidung nach einer mehrtägigen Phlorrhizinbehandlung der Tiere überdauern kann. Erst allmählich renkt sich der Stoffwechsel wieder in die normalen Geleise ein. So könnte insbesondere auch der fast vollständigen Hemmung der Zuckeroxydation während der Phlorrhizinvergiftung eine partielle Oxydationshemmung als Nachwirkung folgen. Dann würde gerade in dieser Nachperiode eine Vermehrung des dysoxydablen Harnkohlenstoffs zu erwarten sein. Alle diese Fragen sind Gegenstand meiner vorliegenden Studien.

Besprechung der Versuche.

Die Versuchsanordnung war folgende. Der Hund 1 mit einem Körpergewicht von 7,3 kg bekam als tägliche Nahrung 40 g Weizeneiweiß, 60 g Reis, 18 g Butter, 2 g Salzgemisch und später auch noch 60 ccm frischen Citronensaft. Der Hund 2 mit einem Körpergewicht von 6,1 kg erhielt 25 g Weizeneiweiß, 40 g Reis, 25 g Butter, 2 g Salzgemisch und 60 ccm frischen Citronensaft. Der Hund 3 erhielt bei einem Körpergewicht von 8,8 kg die ersten 5 Tage 40 g Weizeneiweiß, 70 g Reis, 30 g Butter, 2 g Salzgemisch und 60 ccm frischen Citronensaft, und als er dann diese Nahrung verweigerte, bekam er 250 g frisches Pferdefleisch, 40 g Reis, 20 g Schmalz, 2 g Salzgemisch. Bei diesem Hunde 3 gab ich bei einem zweiten Phlorrhizinversuch, den ich mit ihm anstellte, zu der letzgenannten Nahrung noch täglich anfangs 30, später 50 g Traubenzucker in der Absicht, eine möglichst gleichmäßige Versorgung des Körpers mit Kohlehydrat angesichts der Zuckerverluste durch den Harn zu sichern. Diese Zuckerzulage in dem zweiten Phlorrhizinversuch änderte aber nichts an dem Ergebnis. Das Resultat war in beiden Phlorrhizinversuchen bei diesem Tiere dasselbe.

Zu bemerken ist noch, daß die Hunde 1 und 2 während des Versuchs ein wenig an Körpergewicht abnahmen, während der Hund 3 dauernd an Körpergewicht leicht zunahm.

Zum Verständnis der folgenden Ausführung ist es erforderlich, noch einige technische Bemerkungen hier einzufügen. Die Quotientzahlen stellen die Durchschnittswerte in den einzelnen Versuchsperioden dar. Wenn keine Glykosurie in einer Periode bestand, dann wurde der Quotient aus der gesamten faktisch gefundenen C-Menge des Harns berechnet. Wenn während der ganzen Periode Glykosurie bestand, so wurde der Quotientberechnung derjenige C-Wert zugrunde gelegt, der nach Abzug des im Traubenzucker enthaltenen C vom Gesamt-C des Harns erhalten wurde. Den Zucker bestimmte ich immer polarimetrisch und titrimetrisch nach *Bertrand*. Bei der Titration findet man gewöhnlich ein wenig mehr Zucker als bei der Polarisation. Die Differenz ist aber meistens so gering,

daß der Quotientwert nur wenig, höchstens in der zweiten Dezimale um eine Kleinigkeit differiert. Ausnahmsweise können aber die Differenzen auch größer sein. Ich führe folgende beliebige Beispiele aus meinen Versuchen an. Der Zucker-C wurde aus dem Zuckerwert durch Multiplikation dieses letzteren mit 0,4 gewonnen. 1 Grammolekül Traubenzucker $C_6H_{12}O_6$ wiegt 180 g und enthält 72 g Kohlenstoff. 1 g Traubenzucker enthält dementsprechend 72 : 180 = 0,4 g C.

Tabelle I.

Harn	N	Total C	Zucker Titr.	Zucker C Titr.	Zucker Pol.	Zucker C Pol.	Rest C Titr.	Rest C Pol.	Rest C : N	Rest C : N
ccm	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
800	6,68	12,08	21,52	8,61	21,20	8,48	3,47	3,60	0,52	0,54
690	4,25	7,27	11,73	4,692	11,04	4,416	2,578	2,854	0,61	0,67
230	3,22	6,14	10,69	4,28	9,59	3,84	1,86	2,30	0,58	0,71

Da nun der Titrationszuckerwert für den Zucker größere Zucker-C-Mengen gibt als der Polarisationswert und demnach auch bei Benutzung des Titrationswertes der Rest-C geringer ist als der Rest-C bei Benutzung des Polarisationswertes, und da deshalb auch der Restquotient C : N bei Benutzung des Titrationswertes niedriger ist als bei Benutzung des Polarisationswertes, habe ich allen Restquotientberechnungen in meiner Arbeit den *Titrationswert* des Zuckers zugrunde gelegt, damit man mir bei der erwarteten Erhöhung dieses Quotienten infolge einer dysoxydativen Störung im Stoffwechsel nicht den Vorwurf machen kann, eine solche Erhöhung sei nur durch die Verwendung des Polarisationswertes zustande gekommen. Wenn man diesen Wert benutzt, dann sind die bereits mit dem Titrationswert gefundenen Restquotienterhöhungen natürlich noch größer. Nur in den Fällen, in denen wir mit Hilfe des Titrationswertes eine Senkung des Restquotienten fanden, könnte man einwenden, daß diese Senkung nur durch die Rechnung mit dem Titrationswert herbeigeführt sei, und daß sie mit Hilfe des Polarisationswertes nicht gefunden würde. Das ist auch in der Tat der Fall. Während also in den Fällen, in denen unter Benutzung des Titrationswertes eine Erhöhung des Restquotienten gefunden wurde, diese Erhöhung hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Darstellung der Stoffwechsellage als zweifellos gesichert gelten darf, muß in den Fällen, in denen unter Benutzung des Titrationswertes eine Senkung des Restquotienten sich herausstellte, dieser Befund als nicht ganz so sicher hinsichtlich seiner Bedeutung für die Erkenntnis der Oxydationsprozesse im intermediären Stoffwechsel bezeichnet werden.

In den Versuchsperioden nun (Zwischenperioden und Nachperioden), in denen kein Phlorrhizin mehr injiziert wurde, aber in denen in den ersten Tagen noch Glykosurie bestand, später aber der Harn zuckerfrei war, habe ich die Mittelwerte für den Quotienten berechnet unter Zugrundelegung der Rest-C-Werte in den zuckerhaltigen und der Gesamt-C-Werte in den zuckerfreien Harnen.

Methodisch ist noch zu bemerken, daß ich die C-Bestimmungen nach der in der Arbeit von *Gomez* (5) aus dem hiesigen Laboratorium genauer beschriebenen Methode machte mittels Verbrennung des Harns im flüssigen Medium und Wägung der Kohlensäure. Der N wurde nach *Kjeldahl* bestimmt, der Harnstoff nach der Ureasemethode und das Ammoniak nach

der in der Mikromethodik von *Pincussen* (6) angegebenen Methode. Unter Rest-N des Harns ist in dieser Arbeit verstanden der N-Rest, der nach Abzug des im Harnstoff und Ammoniak enthaltenen N vom Gesamt-N übrigbleibt, alles berechnet unter Zugrundelegung der 24stündigen Harnmenge. Der Zucker wurde nach *Bertrand* bestimmt oder polarisiert. Alle Analysen wurden mindestens doppelt ausgeführt, und es wurden nur die Resultate gut übereinstimmender Doppelanalysen verwertet. Jeder analysierte Harn wurde auf Eiweiß, Aceton nach *Legal* und Acetessigsäure nach *Gerhardt* untersucht, in allen Harnen waren diese Reaktionen negativ. In Stichproben wurde auch noch besonders auf β-Oxybuttersäure mittels Vergärung des Harns und Polarisation der Harn geprüft. β-Oxybuttersäure ließ sich niemals nachweisen.

Ich habe mich aus folgenden Gründen nicht nur auf die Ermittlung des N, C und Zuckers im Harn beschränkt, sondern auch den Harnstoff und das Ammoniak bestimmt. Es ist noch immer eine Streitfrage, inwieweit der gesamte C im Harn mit dem Eiweißstoffwechsel zusammenhängt und im Harn an N gekoppelt ist. Darum wollte ich nachsehen, ob gesetzmäßige Beziehungen zwischen dem Gehalt des Harns an Harnstoff, Ammoniak und der Summe der N-haltigen Substanzen, die außer den beiden eben genannten noch im Harn vorkommen, und der Größe des Quotienten C : N bestehen. Man konnte sich vorstellen, daß dieser Quotient um so höher sein würde, je ärmer der Harn an Ammoniak und je reicher er an Harnstoff und besonders an noch C-reicheren N-Verbindungen sein würde, die in der N-Quote des Harns versammelt sind, die man nach Abzug des Ammoniak- und Harnstoff-N vom Gesamt-N erhält. Um nun möglichst genaue Vergleichswerte zu bekommen, habe ich den totalen C-Gehalt des Harns immer mit 100 g angenommen und aus meinen Analysen berechnet, wieviel Ammoniak-N, Harnstoff-N, Rest-N und Gesamt-N auf 100 g C in der einzelnen Harntagesmenge bzw. in den ganzen einzelnen Perioden im Tagesmengendurchschnitt kommen. Diese Untersuchung hat also mit dem eigentlichen Gegenstand meiner Arbeit nur lockere Beziehung. Sie dient vielmehr dem Studium der Frage, aus welchen Quellen im Körper die den Harnquotienten C : N entscheidend bestimmenden C-Mengen stammen, wieweit die Veränderung in dem C-Gehalt des Harns und die Quotientveränderungen mit Veränderungen in der Zusammensetzung des N-haltigen Substanzgemisches des Harns zusammenhängen.

Ich bespreche nun zunächst die an den verschiedenen Hunden angestellten Versuche der Reihe nach.

In den Tabellen bedeutet V = Vorperiode, P_1, P_2 = erste bzw. zweite Phlorrhizinperiode, Z = Zwischenperiode zwischen den beiden Phlorrhizinperioden, N = Nachperiode, d. h. Periode im Anschluß an die letzte Phlorrhizinperiode bei dem betreffenden Hunde. Der Quotient C : N ist, wie früher schon gesagt wurde, in den Perioden, in denen der Harn zuckerfrei war, aus dem Durchschnittswert des gesamten C-Gehaltes des Harns berechnet, in den glykosurischen Perioden aus dem Durchschnittswert des Rest-C unter Zugrundelegung des Titrationswertes, in den Zwischen- und Nachperioden, in denen an den ersten Tagen noch Glykosurie, an den späteren Tagen aber keine Glykosurie mehr bestand, unter Zugrundelegung des Durchschnittswertes für den Rest-C der glykosurischen und für den Gesamt-C der aglykosurischen Tage, im ersteren Falle unter Benutzung des Titrationswertes für den Zucker. Alle Werte sind Durchschnittswerte einer Periode, auf einen Tag berechnet.

Tabelle II.

Hund 1.

Periode	N in g	C in g	C : N	N—U+ in g	$N-NH_3$ in g	Rest-N in g
V	5,50	3,13 (*C*) *)	0,57	—	0,71	—
P_1	6,37	4,74 (*R*) *)	0,75	—	0,50	—
Z	6,88	3,91 (*R* + *C*)	0,57	—	0,81	—
P_2	7,14	2,88 (*R*)	0,39 **)	—	0,71	—
N	5,65	2,82 (*R* + *C*)	0,50	—	0,44	—

*) *C* = Gesamt-C, *R* = Rest-C, *R* + *C* = Berechnung aus Rest-C und Gesamt-C.
**) Bei Benutzung des Polarisationswertes für den Zucker hatte hier der Quotient 0,56 betragen.

Ergebnis.

In den beiden Phlorrhizinperioden und in der Zwischenperiode Vermehrung der N-Ausscheidung. In der ersten Phlorrhizinperiode und der Zwischenperiode Vermehrung der C-Ausscheidung, natürlich nach Abzug des Zucker-C, in der zweiten Phlorrhizinperiode ungefähr normaler C-Wert. In der ersten Phlorrhizinperiode Steigerung des Quotienten, in der zweiten Phlorrhizinperiode fragliche Senkung, wahrscheinlich normales Verhalten des Quotienten. In der Zwischen- und Nachperiode ungefähr normales Verhalten des Quotienten. *Abgesehen von der Glykosurie, ist also eine dysoxydative Störung am C durch die Phlorrhizinbehandlung nur in der ersten Phlorrhizinperiode nachweisbar.*

Tabelle III.

Hund 2.

Periode	N in g	C in g	C : N	N—U+ in g	$N-NH_3$ in g	Rest-N in g
V	4,24	2,54 (*C*)	0,60	1,87	0,24	2,13
P_1	4,64	3,50 (*R*)	0,75	2,33	0,20	2,15
Z	3,99	2,45 (*R* + *C*)	0,61	1,75	0,12	2,12
P_2	4,83	3,06 (*R*)	0,63	1,78	0,15	2,90
N	4,42	3,02 (*R* + *C*)	0,68	1,70	0,17	2,54

Ergebnis.

In den Phlorrhizinperioden leichte Vermehrung der N-Ausfuhr. In der ersten Phlorrhizinperiode stärkere, in der zweiten Phlorrhizinperiode und in der Nachperiode schwächere Vermehrung der C-Ausfuhr. In der ersten Phlorrhizinperiode starke Erhöhung, in der zweiten Phlorrhizinperiode und in der Nachperiode schwache Erhöhung des Quotienten. Trotz starker Steigerung des Quotienten von *V* zu P_1 Gleichbleiben der Ausfuhr von NH_3 und Rest-N, mäßige Steigerung der U+-Ausfuhr. Bei geringer Steigerung des Quotienten von P_2 zu *N* aber leichteste Senkung, fast gleichbleibende U+-Ausfuhr und ebenfalls fast Gleichbleiben der NH_3- und Rest-N-Ausfuhr. Bei starker Senkung des Quotienten von P_1 zu *Z* Senkung der U+-Ausfuhr, bei mäßiger Senkung der NH_3-Ausfuhr und Gleichbleiben der Rest-N-Ausfuhr. Eine gesetzmäßige Beziehung zwischen den Änderungen im Quotienten und den Änderungen in der Mischung der N-haltigen Harnsubstanzen läßt sich nach alledem nicht

nachweisen, und besonders ist dabei bemerkenswert, daß große Schwankungen im Quotienten vorhanden sein können, ohne daß sich die Menge der sehr C-reichen N-Verbindungen, die im Rest-N versammelt sind, wesentlich ändert. Es kann so z. B. der Gesamt-C stark ansteigen (V zu P_1) bei Steigerung der U^+- und Gleichbleiben der NH_3-Ausscheidung, aber auch bei Gleichbleiben der Rest-N-Ausscheidung.

Eine dysoxydative Störung am C ist, abgesehen von der Glykosurie, nur in der ersten Phlorrhizinperiode nachweisbar.

Tabelle IV.

Hund 3.

Der zweite Phlorrhizinversuch an diesem Hunde wurde etwa 2 Wochen nach dem ersten Phlorrhizinversuch angestellt.

Periode	N in g	C in g	C : N	N—U+ in g	N—NH₃ in g	Rest-N in g
V_1	4,98	3,35 (C)	0,67	2,95	0,15	1,87
P_1	6,37	3,68 (R)	0,58 *)	3,30	0,16	2,91
N_1	6,40	3,93 (R)	0,62	2,34	0,14	3,90
V_2	7,16	4,43 (R)	0,62	3,46	0,19	3,51
P_2	5,42	2,91 (R)	0,54 *)	3,04	0,12	2,26
N_2	7,79	4,88 (R)	0,63	3,04	0,20	4,55

*) Bei Benutzung des Polarisationswertes für die Dextrose zur Berechnung des Rest-C hätte der Quotient im ersteren Falle 0,66 und im zweiten Falle 0,64 betragen.

Anmerkung: Es sei hier daran erinnert, daß bei diesem Hunde im Anschluß an die erste Phlorrhizinperiode mit Ausnahme der ersten beiden Tage der ersten Nachperiode (N_1) dauernd eine linksdrehende, reduzierende Substanz in geringer Menge durch den Harn ausgeschieden wurde. Da es sich wahrscheinlich um Glykuronsäure handelte und diese denselben Reduktionswert wie Traubenzucker hat, glaubte ich keinen in Betracht kommenden Fehler zu machen, wenn ich den Reduktionswert auf Traubenzucker umrechnete und aus dem so erhaltenen Traubenzucker den C-Gehalt ermittelte und diesen C-Wert von dem Gesamt-C-Wert des Harns zur Feststellung des Rest-C-Wertes abzog.

Ergebnis.

In der ersten Phlorrhizinperiode und der ersten Nachperiode Erhöhung, in der zweiten Phlorrhizinperiode Senkung der N-Ausscheidung. In der ersten Phlorrhizin- und Nachperiode leichte Erhöhung der C-Ausscheidung. In der zweiten Phlorrhizinperiode C-Ausscheidung nur wenig höher als in V_1. In beiden Phlorrhizinperioden Senkung des Quotienten, in den beiden Nachperioden im ersten Falle leichte Erhöhung, aber immer noch Senkung des Quotienten im Vergleich zur ersten Vorperiode, im zweiten Falle Höhe des Quotienten wie in der zweiten Vorperiode. Jedenfalls in keiner Nachperiode Steigerung des Quotienten über den Normalwert der Vorperiode.

Mit der Senkung des Quotienten von V_1 zu P_1 Vermehrung der U^+- und Rest-N-Ausscheidung, Gleichbleiben der NH_3-Ausscheidung. Mit der Senkung des Quotienten von V_2 zu P_2 geringe Senkung der U^+- und Senkung der NH_3- und Rest-N-Ausscheidung. Bei Steigerung des Quotienten von P_1 zu N_1 und P_2 zu N_2 einmal Abnahme, einmal Gleichbleiben der

U-Ausscheidung, einmal Gleichbleiben, einmal Zunahme der NH_3-Ausscheidung, beidemal Zunahme der Rest-N-Ausscheidung.

Eine dysoxydative Störung während oder nach der Phlorrhizininjektion ließ sich bei diesem Hunde, abgesehen von der Zucker- und der Glykuronsäure (?)-Ausscheidung in keinem Versuch nachweisen.

Wenn wir alle Versuche bei den drei Hunden zusammenfassend betrachten, dann stellen wir folgendes fest.

Abgesehen von der Zuckerausscheidung und der Glykuronsäureausscheidung (?), wurde in sechs Phlorrhizinversuchen nur zweimal eine noch anderweitig vorhandene dysoxydative Störung am Kohlenstoff während der Phlorrhizininjektionen gesehen. Daraus ergibt sich, daß das Phlorrhizin in der Regel zu einer vollständigen Hemmung des Zuckerabbaues, abgesehen von seinen anderen Wirkungen, führt, und daß nur ausnahmsweise auch noch andere dysoxydative Störungen am Kohlenstoff mit unterlaufen, die dann zu einer im Vergleich zum N vermehrten Ausscheidung von dysoxydablem C im Harn führen, wobei dieser C aber nicht in optisch aktiven und die *Fehling*sche Lösung reduzierenden Verbindungen und auch nicht in der Form von Ketonkörpern im Harn erscheint.

Konstante Beziehungen zwischen der Komposition der Mischung der N-haltigen Harnsubstanz und der Lage des Quotienten C : N ließen sich nicht nachweisen. Diese Erfahrung bestätigt auch eine Berechnung, bei der der in einzelnen Perioden als U^+- oder NH_3- oder Rest-N zur Ausscheidung gelangende N auf 100 g C bzw. Rest-C des Harns ermittelt wurde. Die Tabelle V enthält diese Berechnung.

Tabelle V.

	C : N bzw. Rest-C : N bzw. C + Rest-C : N	Auf 100 g C bzw. Rest-C kommen ? g N als Ammoniak	Auf 100 g C bzw. Rest-C kommen ? g N als Harnstoff	Auf 100 g C bzw. Rest-C kommen ? g N als Rest-N	Auf 100 g C bzw. Rest-C kommen ? g N als Total-N
Erster Hund	0,57	V 25,26 (C)			176,15 (C)
	0,75	P_1 9,65 (R)			165,23 (R)
	0,57	Z 19,73 ($R+C$)			179,22 ($R+C$)
	0,39	P_2 25,82 (R)			259,08 (R)
	0,50	N 15,97 ($R+C$)			216,42 ($R+C$)
Zweiter Hund	0,60	V 9,98 (C)	74,03 (C)	84,00 (C)	168,01 (C)
	0,75	P_1 5,90 (R)	68,47 (R)	64,08 (R)	138,44 (R)
	0,61	Z 5,02 ($R+C$)	71,50 ($R+C$)	91,42 ($R+C$)	168,09 ($R+C$)
	0,63	P_2 4,94 (R)	59,29 (R)	94,12 (R)	158,35 (R)
	0,68	N 5,73 (R)	60,84 (R)	84,25 (R)	150,83 (R)
Dritter Hund (A)	0,67	V_1 4,69 (C)	90,99 (C)	52,71 (C)	148,39 (C)
	0,58	P_1 4,22 (R)	90,74 (R)	76,11 (R)	171,06 (R)
	0,62	N_1 3,43 (R)	62,89 (R)	97,07 (R)	163,40 (R)
Dritter Hund (B)	0,62	V_2 4,35 (R)	76,44 (R)	79,68 (R)	160,47 (R)
	0,54	P_2 4,12 (R)	104,96 (R)	76,84 (R)	185,91 (R)
	0,63	N_2 4,18 (R)	62,62 (R)	92,19 (R)	158,99 (R)

(C) = Zugrundelegung des Gesamt-C. (R) = Zugrundelegung des Rest-C. ($R + C$) = Zugrundelegung d. Mittelwertes v. Gesamt-C u. Rest-C in aglycosurischen bzw. den glycosurischen Zeiten.

T[illegible]

Datum	Körpergewicht		Harnmenge		N-Harn		N-Ammoniak		N-Harnstoff	Rest-N	
5. VIII.	7350		355		6,04		—				3
6. VIII.	7450		205		3,82		0,642				2
7. VIII.	7450	7330	510	402	6,71	5,50	0,278	0,71			3
8. VIII.	7200		480		5,91		0,960				3
9. VIII.	7200		460		5,01		0,950				2
10. VIII.	7250		570		—		1,276				–
11. VIII.	7250		285		4,79		0,197				9
12. VIII.	6800		340		6,33		0,262				13
13. VIII.	6800	6836	460	480	6,95	6,37	0,301	0,50			14,
14. VIII.	6700		555		6,92		0,513				13,
15. VIII.	6600		435		4,99		0,292				14,
16. VIII.	6450		715		8,21		0,656				16,
17. VIII.	6350		738		9,20		1,736				17,
18. VIII.	6200		500		8,34		1,254				5,
19. VIII.	6100		567		6,35		0,730				4,
20. VIII.	6100	6081	360	520	4,84	6,88	0,250	0,81			2,
21. VIII.	6000		570		7,74		0,849				4,
22. VIII.	5950		375		4,25		0,446				2,
23. VIII.	5850		530		7,42		0,434				4,
24. VIII.	5800		575		—		0,740				—
25. VIII.	5750	5713	400	524	7,57		0,470	0,71			9,
26. VIII.	5600		630		7,06	7,14	1,035				13,
27. VIII.	5700		490		7,48		0,576				9,
28. VIII.	5600		445		5,86		0,726				3,
29. VIII.	5600		400		5,04		0,398				2,
30. VIII.	—		12		—		—				—
31. VIII.	5600		550		6,16		0,368				3,
1. IX.	5550	5511	555	463	6,37	5,65	0,559	0,44			3,
2. IX.	5510		585		5,90		0,352				3,
3. IX.	5350		565		5,54		0,364				2,
4. IX.	5500		810		5,54		0,385				2,
5. IX.	5310		525		5,81		0,427				1,
6. IX.	5350		180		4,69		0,339				1,
7. IX.	5400		535		6,82		0,452				10,0
8. IX.	—		440		3,33		0,402				7,3

In den Tabellen bedeuten die Analysenzahlen g. — Die Quotientzahlen in ( ) bedeuten di

…	Rest-C	C : N	Rest-C : N	Ammoniak	Harnstoff	Zucker
		0,63		—		
		0,57		0,779		
		0,55 } 0,57		0,337		
		0,56		1,166 } 0,86		
		0,55		1,154		
	—	—	—	1,550		—
	4,738	2,01	0,99	0,239		12,255
	3,916	2,10	0,62	0,318		23,460
1,84	3,524 } 4,74	2,07 } 2,13	0,51 } 0,75	0,366 } 0,61		27,140 } 23,28
	1,998	1,93	0,29	0,623		28,305
	5,396	2,86	1,08	0,355		22,185
	8,868	2,02	1,07	0,797		26,305
	6,117	1,92	0,66	2,108		28,782
1,37	4,040 } 4,25	0,67	0,48 } 0,39	1,523		3,900 } 8,42
	4,194	0,72	0,66	0,886		0,964
	2,653	0,55 } 0,85	0,55	0,303 } 0,99		0,043
		0,54		1,031		
	(*3,91*)	0,52	(*0,57*)	0,542		
		0,54		0,527		
	—	—	—	0,899		—
	2,160	1,28	0,29	0,571		18,800
0,03	2,512 } 2,88	1,93 } 1,48	0,36 } 0,39	1,257 } 0,86		27,720 } 20,08
	3,972	1,26	0,53	0,700		13,720
0,07	3,013 } 2,98	0,53	0,51 } 0,55	0,882		0,267 } 0,14
	2,938	0,59	0,58	0,483		0,080
		—		—		
		0,56		0,449		
		0,57 } 0,50		0,679 } 0,53		
	(*2,82*)	0,52	(*0,50*)	0,428		
		0,51		0,442		
		0,47		0,468		
		0,33		0,518		
		0,42		0,412		
4,88	3,640 } 3,84	1,48		0,528		
	4,036	2,22		0,488		

… der einzelnen Perioden aus den Gesamt- und Restquotienten der jeweiligen Periodentage.

Datum	Körpergewicht		Harnmenge		N-Harn		N-Ammoniak		N-Harnstoff		Rest-N	
15. IX.	6150		740		4,04		0,290		1,841		1,909	
16. IX.	6200		670		2,63		0,197		1,113		1,320	
17. IX.	6200	6162	795	705	5,12	4,24	0,278	0,24	2,838	1,87	2,004	2,13
18. IX.	6210		630		3,04		0,190		1,184		1,666	
19. IX.	6200		580		4,47		0,211		2,108		2,151	
20. IX.	6050		815		6,16		0,285		2,117		3,758	
21. IX.	6130		510		3,21		0,121		1,977		1,112	
22. IX.	6130		690		4,25		0,145		1,399		2,706	
23. IX.	5900	6030	655	618	4,95	4,64	0,192	0,20	2,702	2,33	2,056	2,15
24. IX.	6000		658		5,16		0,258		2,944		1,958	
25. IX.	6000		575		5,64		0,290		2,605		2,745	
26. IX.	5930		690		5,12		0,149		3,228		1,743	
27. IX.	6000		490		3,64		0,110		0,988		2,542	
28. IX.	6000		600		4,03		0,092		1,911		2,027	
29. IX.	5850		725		5,48		0,181		1,856		3,443	
30. IX.	5840		535		3,30		0,091		1,526		1,683	
1. X.	5810	5871	458	533	4,10	3,99	0,166	0,12	2,101	1,75	1,833	2,12
2. X.	5900		450		3,30		0,111		0,597		2,592	
3. X.	5900		660		5,17		0,124		2,600		2,446	
4. X.	5880		410		3,21		0,063		1,016		2,131	
5. X.	5820		475		3,65		0,134		1,966		1,550	
6. X.	5750		375		2,84		0,096		1,465		1,279	
7. X.	5850		652		5,11		0,091		1,295		3,724	
8. X.	5850		530		5,05		0,170		2,023		2,857	
9. X.	5750	5790	—	535	—	4,83	—	0,15	—	1,78	—	2,90
10. X.	5750		545		4,81		0,183		2,210		2,417	
11. X.	5750		418		4,33		0,147		1,600		2,583	
12. X.	5600		550		4,62		0,079		1,707		2,834	
13. X.	5650		610		4,53		0,180		1,697		2,653	
14. X.	5600		480		3,76		0,121		1,458		2,181	
15. X.	5650	5621	570	536	5,43	4,42	0,271	0,17	1,722	1,70	3,437	2,54
16. X.	5650		530		4,16		0,178		1,452		2,530	
17. X.	—		560		4,08		0,212		2,153		1,715	
18. X.	5550		405		4,20		0,153		2,022		2,025	
19. X.	5650		580		4,55		0,195		1,380		2,975	

r	Rest-C		C : N		Rest-C : N		Ammoniak		Harnstoff		Zucker	
			0,62				0,352		3,946			
			0,59				0,239		2,389			
			0,58				0,338		6,082			
			0,58	0,60			0,231	0,27	2,537	4,00		
			0,57				0,256		4,518			
			0,62				0,346		4,538			
	2,356		2,07		0,73		0,147		4,237		10,710	
	2,578		1,71		0,61		0,176		2,997		11,730	
,87	5,272	3,50	2,60	2,23	1,07	0,75	0,233	0,24	5,789	4,92	18,995	17,16
	3,585		2,53		0,69		0,313		6,308		23,688	
	3,680		2,12		0,65		0,352		5,582		20,700	
	3,898		1,14		0,76		0,181		6,917		4,83	
,68	1,861	2,49	0,53		0,51	0,56	0,133		2,117		0,147	1,70
	1.712		0,44		0,42		0,112		4,094		0,12	
			0,61				0,220		3,977			
			0,62				0,110		3,270			
			0,62	0,66			0,201	0,15	4,503	3,75		
			0,62			*(0,61)*	0,135		1,279			
		(2,45)	0,73				0,150		5,572			
			0,59				0,077		2,177			
			0,59				0,162		4,212			
			0,62				0,117		3,140			
	3,388		1,57		0,66		0,111		2,774		11,606	
	3,206		2,05		0,63		0,207		4,335		17,861	
0,62	—	3,06	—	2,01	—	0,63	—	0,18	—	3,82	—	16,55
	2,751		2,05		0,57		0,222		4,735		17,822	
	2,883		2,41		0,67		0,178		3,429		18,894	
	2,612		0,89		0,57		0,096		3,658		3,795	
	2,829		0,66		0,62		0,218		3,637		0,427	
	2,606		0,73		0,69		0,148		3,124		0,336	
0,33	4,383	3,02	0,83	0,75	0,81	0.68	0,329	0,21	3,689	3,64	0,342	0,82
	2,853		0,72		0,68		0,216		3,112		0,318	
	2,458		0,63		0,60		0,257		4,614		0,280	
	3,025		0,75		0,72	*(0,68)*	0,186		4,332		0,263	
			0,74				0,237		2,958			

Datum	Körpergewicht		Harnmenge		N-Harn		N-Ammoniak		N-Harnstoff		Rest-N		C
1. XI.	8 850		—		—		—		—		—		—
2. XI.	9 030		410		3,079		0,092		1,868		1,127		2,04
3. XI.	9 250		410		4,190		0,181		2,956		1,053		2,88
4. XI.	9 130		580		5,684		0,195		3,248		2,241		3,48
5. XI.	9 020	9 021	—	460	—	*4,98*	—	0,15	—	2,95	—	1,87	—
6. XI.	8 600		—		—		—		—		—		—
7. XI.	9 010		350		4,704		0,099		2,920		1,685		3,54
8. XI.	9 200		400		4,144		0,134		3,024		0,986		2,81
9. XI.	9 100		610		8,028		0,222		3,672		4,134		5,34
10. XI.	8 850		800		6,686		0,156		4,368		2,162		12,08
11. XI.	8 950		320		4,405		0,076		2,106		1,223		8,27
12. XI.	9 225	9 069	560	574	7,526	6,37	0,204	0,16	3,763	3,30	3,559	2,91	12,60
13. XI.	9 220		530		7,197		0,186		3,787		3,224		9,38
14. XI.	9 100		660		7,023		0,170		2,495		4,358		14,24
15. XI.	9 200		390		4,532		0,120		2,839		1,573		6,290
16. XI.	9 200		560		8,938		0,273		3,606		5,059		6,054
17. XI.	9 270		400		6,272		0,106		1,904		4,262		4,490
18. XI.	9 370		240		3,578		0,068		1,142		2,368		2,568
19. XI.	9 370	9 368	690	438	9,080	6,40	0,184	0,14	2,801	2,34	6,095	3,90	5,758
20. XI.	9 450		440		6,776		0,117		2,464		4,195		4,560
21. XI.	9 530		—		—		—		—		—		—
22. XI.	9 450		260		4,440		0,087		1,857		2,496		2,985
23. XI.	9 480		480		7,594		0,130		2,285		5,179		5,147

Datum	Körpergewicht		Harnmenge		N-Harn		N-Ammoniak		N-Harnstoff		Rest-N		Cl
3. XII.	10 000		196		4,445		0,122		1,663		2,660		3,102
4. XII.	9 870	9 922	780	559	8,627	*7,16*	0,197	0,19	4,368	3,46	4,062	3,51	5,476
5. XII.	9 970		540		7,106		0,212		4,158		2,736		4,636
6. XII.	9 850		720		8,467		0,242		3,629		4,596		5,777
7. XII.	9 860		230		3,220		0,055		1,835		1,330		6,135
8. XII.	10 000		550		4,312		0,092		2,464		1,756		9,693
9. XII.	9 900	10 066	510	498	6,212	*5,42*	0,182	0,12	4,072	3,04	1,956	2,26	10,691
10. XII.	10 170		600		6,804		0,168		3,192		3,444		12,862
11. XII.	10 400		600		6,552		0,118		3,612		2,822		11,703
12. XII.	—		745		10,847		0,261		3,651		6,935		8,924
13. XII.	10 150		720		5,746		0,157		2,318		3,271		3,998
14. XII.	10 500	10 355	540	623	6,880	*7,79*	0,203	0,20	3,145	3,04	3,532	4,55	4,636
15. XII.	10 220		570		8,140		0,192		4,038		3,910		5,584
16. XII.	10 550		540		7,333		0,197		2,041		5,095		4,881

rsuch).

	Rest-C	C:N	Rest-C:N	Ammoniak	Harnstoff	Zucker
		—		—	—	
		0,663		0,112	3,985	
		0,687		0,220	6,335	
		0,612		0,237	6,960	
		— } 0,67		— } 0,19	— } 6,32	
		—		—	—	
		0'753		0,121	6,258	
		0,678		0,163	6,480	
		0,665		0,270	7,869	
	3,475	1,807	0,520	0,190	9,360	21,520
	2,466	2,431	0,724	0,092	4,512	14,528
,63	4,567 } *3,68*	1,675 } 1,78	0,607 } 0,58	0,248 } 0,21	8,064 } 7,08	19,954 } 19,06
	3,808	1,304	0,529	0,297	8,115	13,939
	4,106	2,028	0,585	0,207	5,346	25,344
	2,468	1,388	0,545	0,146	6,084	9,555
	5,584	0,667	0,624	0,332	7,728	1,176
	4,167	0,716	0,664	0,129	4,080	0,808
	2,309	0,718	0,645	0,082	2,448	0,648
,81	2,275 } *3,93*	0,634 } 0,74	0,581 } 0,62	0,223 } 0,17	6,003 } 6,22	1,208 } 2,01
	4,182	0,673	0,617	0,142	5,280	0,946
	—	—	—	—	—	—
	2,756	0,672	0,621	0,106	3,980	0,572
	4,667	0,678	0,615	0,158	4,896	1,200

Versuch).

r	Rest-C	C:N	Rest-C:N	Ammoniak	Harnstoff	Zucker
	2,969	0,698	0,668	0,148	3,563	0,333
1,32	5,008 } *4,43*	0,635 } 0,66	0,581 } 0,62	0,239 } 0,24	9,360 } 7,40	1,170 } 0,79
	4,377	0,652	0,616	0,257	8,910	0,648
	5,374	0,682	0,634	0,294	7,776	1,008
	1,857	1,905	0,577	0,067	3,933	10,695
	2,213	2,248	0,513	0,112	5,280	18,700
1,30	3,307 } *2,91*	1,721 } 1,88	0,532 } 0,54	0,224 } 0,15	8,726 } 6,50	18,462 } 18,26
	3,886	1,890	0,571	0,204	6,840	22,440
	3,303	1,786	0,504	0,143	7,740	21,000
	6,600	0,823	0,608	0,317	7,823	5,811
	3,955	0,696	0,688	0,191	4,968	0,108
0,72	4,085 } *4,88*	0,674 } 0,72	0,594 } 0,63	0,247 } 0,25	6,739 } 6,51	1,377 } 1,80
	5,219	0,686	0,641	0,233	8,653	0,912
	4,557	0,666	0,621	0,239	4,374	0,810

Tabelle X. Hund 1.

Datum	NH_3-N auf 100 g C berechnet	U+ — N auf 100 g C berechnet	Rest-N auf 100 g C berechnet	Total-N auf 100 g C berechnet	NH_3-N auf 100 g Rest-C berechnet	U+ — N auf 100 g Rest-C berechnet	Rest-N auf 100 g Rest-C berechnet	Total-C auf 100 g Rest-C berechnet
5. VIII.	—			159,37				
6. VIII.	29,59			170,04				
7. VIII.	7,57 } *25,26*			182,83 } *176,15*				
8. VIII.	29,18			179,64				
9. VIII.	34,70			182,85				
10. VIII.	36,05			180,23				
11. VIII.	2,04			49,75	4,16			101,10
12. VIII.	1,97			47,59	6,69			161,64
13. VIII.	2,09 } 7,43			48,33 } 66,04	8,54			197,22
14. VIII.	3,85			51,95	25,68 } *9,65*			346,35 } *165,23*
15. VIII.	2,05			34,97	5,41			92,48
16. VIII.	3,95			49,49	7,40			92,58
17. VIII.	9,85			52,13	28,38			150,40
18. VIII.	22,39			131,07	31,04 } 21,66			206,44 } 172,67
19. VIII.	15,94			138,65	17,41			151,41
20. VIII.	9,36 } 15,57			181,27 } 152,42	9,80			182,43
21. VIII.	20,31			185,17	(*19,73*)			
22. VIII.	20,37			194,06				(*179,22*)
23. VIII.	10,80			184,58				
24. VIII.	32,89			286,22	—			
25. VIII.	4,86			78,20	21,76			298,15
26. VIII.	7,61 } 12,86			51,91 } 123,85	41,20 } 25,82			301,35 } 259,08
27. VIII.	6,09			79,07	14,50			177,74
28. VIII.	23,27			187,82	24,90 } 19,23			248,26 } 223,86
29. VIII.	13,37			169,70	13,55			199,46
30. VIII.	—			—				
31. VIII.	10,70			179,07	(*15,97*)			(*216,42*)
1. IX.	15,40			175,48				
2. IX.	11,43 } 15,77			191,56 } 206,40				
3. IX.	12,77			194,39				
4. IX.	14,98			211,67				
5. IX.	22,59			307,41				
6. IX.	17,38			240,51				

Datum	NH_3—N auf 100 g C berechnet		Ur-N auf 100 g C berechnet		Rest-N auf 100 g C berechnet		Total-N auf 100 g C berechnet		NH_3—N auf 100 g Rest-C berechnet		Ur-N auf 100 g Rest-C berechnet		Rest-N auf 100 g Rest-C berechnet		Total-N auf 100 g Rest-C berechnet	
15. IX.	11,51		73,06		75,75		160,32									
16. IX.	12,63		71,35		84,62		168,59									
17. IX.	9,30	*9,98*	94,92	*74,03*	67,02	*84,00*	171,24	*168,01*								
18. IX.	10,73		66,89		94,12		171,75									
19. IX.	8,27		82,67		84,35		175,29									
20. IX.	7,44		55,30		98,12		160,84									
21. IX.	1,82		29,77		16,75		48,34		5,14		83,91		47,20		136,25	
22. IX.	1,99		19,24		37,22		58,46		5,62		54,27		104,97		164,86	
23. IX.	1,49	1,94	20,99	22,86	15,98	21,58	38,46	46,39	3,64	*5,90*	51,25	*68,47*	39,00	*64,08*	93,89	*138,44*
24. IX.	1,98		22,54		14,99		39,51		7,20		82,12		54,62		143,93	
25. IX.	2,42		21,78		22,95		47,16		7,88		70,79		74,59		153,26	
26. IX.	2,56		55,37		29,90		87,82		3,82		82,81		44,72		131,35	
27. IX.	5,73		51,46		132,40		189,58		5,91	5,03	53,09	82,51	136,59	99,90	195,59	108,98
28. IX.	5,23		108,58		115,17		228,98		5,37		111,62		118,40		235,40	
29. IX.	5,45		55,90		103,70		165,06									
30. IX.	4,46		74,80		82,50		161,76									
1. X.	6,54	4,87	82,72	68,58	72,17	89,40	161,42	162,85		*(5,02)*		*(71,50)*		*(91,42)*		*(168,09)*
2. X.	5,39		28,98		125,83		160,19									
3. X.	3,29		68,97		64,88		137,14									
4. X.	3,33		53,76		112,75		169,84									
5. X.	6,18		90,60		71,43		168,20									
6. X.	5,45		83,24		72,67		161,36									
7. X.	1,13		16,13		46,38		63,64		2,69		38,22		109,92		150,83	
8. X.	1,64		19,55		27,61		48,79		5,30		63,10		89,11		157,52	
9. X.	—	1,51	—	18,35	—	30,80	—	50,65	—	*4,94*	—	*59,29*	—	*94,12*	—	*158,35*
10. X.	1,85		22,37		24,46		48,68		6,65		80,33		87,86		174,84	
11. X.	1,41		15,33		24,74		41,48		5,10		55,50		89,60		150,19	
12. X.	1,91		41,33		68,62		111,86		3,02		65,35		108,50		176,88	
13. X.	6,00		56,57		88,43		151,00		6,36		59,99		93,78		160,13	
14. X.	4,42		53,21		79,60		137,23		4,64		55,95		83,69		144,28	
15. X.	6,00	5,40	38,10	53,41	76,04	77,16	120,13	135,97	6,18	*5,73*	39,29	*60,84*	78,42	*84,25*	123,89	*150,83*
16. X.	5,97		48,72		84,90		139,60		6,24		50,89		88,68		145,81	
17. X.	8,25		83,77		66,73		158,75		8,62		87,59		69,77		165,99	
18. X.	4,89		64,60		64,70		134,19		5,06		66,84		66,94		138,84	
19. X.	5,79		40,95		88,28		135,01									

Tabelle XII. Hund 3 (erster Versuch).

Datum	NH_3-N auf 100 g C berechnet	U+—N auf 100 g C berechnet	Rest-N auf 100 g C berechnet	Total-N auf 100 g C berechnet	NH_3-N auf 100 g Rest-C berechnet	U+—N auf 100 g Rest-C berechnet	Rest-N auf 100 g Rest-C berechnet	Total-N auf 100 g Rest-C berechnet
1. XI.	—	—	—	—				
2. XI.	4,51	91,18	55,25	150,94				
3. XI.	6,28	102,64	36,56	145,49				
4. XI.	5,60	93,33	64,40	163,33				
5. XI.	— } *4,69*	— } *90,99*	— } *52,71*	— } *148,39*				
6. XI.	—	—	—	—				
7. XI.	2,80	82,42	47,56	132,77				
8. XI.	4,77	107,62	35,09	147,47				
9. XI.	4,16	68,75	77,40	150,31				
10. XI.	1,29	36,15	17,89	55,33	4,49	125,70	62,22	192,40
11. XI.	0,92	25,44	14,78	41,14	3,08	85,40	49,59	138,08
12. XI.	1,62 } 1,40	29,84 } 29,86	28,23 } 25,17	59,69 } 62,43	4,47 } *4,22*	82,40 } *90,74*	77,93 } *76,11*	164,79 } *171,06*
13. XI.	1,98	40,36	34,36	76,69	4,88	99,45	84,66	189,00
14. XI.	1,19	17,52	30,60	49,30	4,14	60,76	106,14	171,04
15. XI.	1,91	45,14	25,01	72,05	4,86	115,03	63,74	183,63
16. XI.	4,51	59,56	83,56	147,64	4,89	64,58	90,60	160,08
17. XI.	2,36	42,41	94,92	139,69	2,54	45,69	102,28	150,52
18. XI.	2,65	44,47	92,21	139,33	2,94	49,46	102,56	154,96
19. XI.	3,20 } 2,83	48,65 } 50,11	105,85 } 84,72	157,69 } 137,66	3,49 } *3,43*	53,10 } *62,89*	115,55 } *97,07*	172,13 } *163,40*
20. XI.	2,57	54,04	92,00	148,60	2,80	58,92	100,31	162,03
21. XI.	—	—	—	—	—	—	—	—
22. XI.	2,91	62,21	83,62	148,07	3,16	67,38	90,57	161,11
23. XI.	2,53	44,39	100,62	147,54	2,79	48,96	110,97	162,72

Tabelle XIII.

Hund 3 (zweiter Versuch).

Datum	NH_3-N auf 100 g C berechnet		U+ — N auf 100 g C berechnet		Rest-N auf 100 g C berechnet		Total-N auf 100 g C berechnet		NH_3-N auf 100 g Rest-C berechnet		U+ — N auf 100 g Rest-C berechnet		Rest-N auf 100 g Rest-C berechnet		Total-N auf 100 g Rest-C berechnet	
3. XII.	3,93		53,61		85,75		143,29		4,109		56,012		89,592		149,714	
4. XII.	3,60	*4,07*	79,76	*71,47*	74,18	*74,63*	157,54	*150,17*	3,934	4,35	87,220	76,44	81,110	79,68	172,264	160,47
5. XII.	4,57		89,69		59,04		153,28		4,844		94,997		62,509		162,349	
6. XII.	4,19		62,82		79,56		146,56		4,503		67,529		85,523		157,555	
7. XII.	0,90		29,91		21,68		52,49		2,962		98,815		71,621		173,398	
8. XII.	0,95		25,42		18,12		44,49		4,157		111,342		79,349		194,849	
9. XII.	1,72	1,18	38,09	29,82	18,30	21,80	58,10	52,79	5,564	*4,12*	123,133	*104,96*	59,147	*76,84*	187,844	*185,91*
10. XII.	1,31		24,82		26,78		52,90		4,323		82,141		88,626		175,090	
11. XII.	1,01		30,86		24,11		55,99		3,573		109,355		85,437		198,365	
12. XII.	2,92		40,91		77,71		121,55		3,955		55,318		105,076		164,349	
13. XII.	3,93		57,98		81,82		143,72		3,970		58,609		82,705		145,284	
14. XII.	4,38	3,74	67,84	56,17	76,19	82,03	148,40	141,94	4,969	*4,18*	76,989	*62,62*	86,463	*92,19*	168,421	*158,99*
15. XII.	3,44		72,31		70,02		145,77		3,678		77,371		74,919		155,969	
16. XII.	4,04		41,82		104,40		150,24		4,323		44,788		111,806		160,917	

Tabelle XIV.

Erster Hund. Datum	Nahrung		Zweiter Hund. Datum	Nahrung	
5. VIII.	Reis	60 g	15. IX.	Reis	40 g
bis	Eiweiß	40 g	bis	Eiweiß	25 g
10. VIII.	Butter	18 g	19. X.	Butter	25 g
	Salzgemisch	2 g		Salzgemisch	2 g
				Citronensaft	60 ccm
11. VIII.	Hunger				
12. VIII. bis 29. VIII.	Dasselbe wie vorher				
30. VIII. bis 9. IX.	Dasselbe wie vorher + 60 ccm Citronensaft.				

Erster Hund. Datum	Phlorrhizin		Zweiter Hund. Datum	Phlorrhizin	
10. VIII.	0,21 g in 10 ccm dest. Wassers gelöst	3,0 ccm	21. IX.	0,186 g in 10 ccm dest. Wassers gelöst	3,0 ccm
11. VIII.	0,21 g desgleichen	4,0 „	22. IX.	0,186 g desgleichen	4,0 „
12. VIII.	0,21 g „	4,0 „	23. IX.	0,184 g „	4,0 „
13. VIII.	0,2 g „	4,0 „	24. IX.	0,184 g „	4,0 „
14. VIII.	0,2 g „	4,0 „	25. IX.	0,177 g „	4,0 „
15. VIII.	0,2 g „	4,0 „	7. X.	0,175 g „	3,0 „
16. VIII.	0,2 g „	4,0 „	8. X.	0,175 g „	4,0 „
24. VIII.	0,18 g „	3,0 „	9. X.	0,175 g „	4,0 „
25. VIII.	0,18 g „	4,0 „	10. X.	0,175 g „	4,0 „
26. VIII.	0,18 g „	4,0 „	11. X.	0,172 g „	4,0 „
27. VIII.	0,18 g „	1,5 „			
7. IX.	0,16 g „	3,0 „			
8. IX.	0,16 g „	4,5 „			

Tabelle XIV (Fortsetzung).

Dritter Hund (erster Versuch).

Datum	Nahrung	
1. XI. bis 5. XI.	Reis	70 g
	Eiweiß	40 g
	Butter	30 g
	Salzgemisch	2 g
	Citronensaft	60 ccm
6. XI.	Ohne Nahrung	
7. XI. bis 1. XII.	Pferdefleisch	250 g
	Reis	40 g
	Schmalz	20 g
	Salzgemisch	2 g
2. XII.	Dasselbe wie vorher + 30 g Traubenzucker	

Dritter Hund (zweiter Versuch).

Datum	Nahrung	
3. XII. und 4. XII.	Pferdefleisch	250 g
	Reis	40 g
	Schmalz	20 g
	Salzgemisch	2 g
	Traubenzucker	30 g
5. XII. bis 16. XII.	Dasselbe wie vorher + 50 g Traubenzucker	

Dritter Hund (erster Versuch).

Datum	Phlorrhizin und Mineralwasser	
	Phlorrhizin	
10. XI.	0,276 g in 10 ccm dest. Wassers gelöst	3,0 ccm
11. XI.	0,266 g desgleichen	4,0 „
12. XI.	0,266 g „	4,0 „
13. XI.	0,269 g „	4,0 „
14. XI.	0,269 g „	4,0 „
24. XI.	Mineralwasser 500 ccm per os	
25. XI.	desgleichen	
28. XI.	„	
29. XI.	„	
30. XI.	„	

Dritter Hund (zweiter Versuch).

Datum	Phlorrhizin	
7. XII.	0,296 g in 10 ccm dest. Wasser gelöst	3,0 ccm
8. XII.	0,296 g desgleichen	4,0 „
9. XII.	0,296 g „	4,0 „
10. XII.	0,3 g „	4,0 „
11. XII.	0,3 g „	4,0 „

Aus einer Betrachtung der Tabelle V geht hervor, daß auch bei dieser Berechnung mit einer Steigerung des Quotienten Vermehrung oder Verminderung oder Gleichbleiben des als NH_3 oder U^+ oder Rest-N ausgeschiedenen N, aber in der Regel Verminderung des Total-N verbunden ist, daß mit einer Senkung des Quotienten der N im NH_3 unverändert, im U^+ und Rest-N vermehrt, vermindert oder unverändert, aber der Total-N in der Regel vermehrt ausgeschieden wird, und daß bei gleichen Quotienten zu verschiedenen Zeiten bei demselben Tiere verschiedene N-Mengen als NH_3, U^+ oder Rest-N, ja sogar als Total-N eliminiert werden.

Der gesamte N-Gehalt des Harns beeinflußt natürlich in entscheidender Weise den Quotienten, aber ein höherer oder niederer Quotient ist nicht un bedingt an einen höheren oder niederen Gehalt des Harns, an eine bestimmte N-Quote und die an sie eventuell gekoppelte C-Masse geknüpft.

Diese Berechnung, wie auch die früher mitgeteilten Werte für NH_3, U^+ und Rest-N machen es also im höchsten Grade wahrscheinlich, daß bei der Gestaltung des Quotienten C : N noch andere C-Verbindungen einen maßgebenden Einfluß ausüben, die im Harn nicht an N gekoppelt sind. Ich begnüge mich mit diesem Hinweis. Ich wüßte nicht, wie man anders meine analytischen Befunde deuten soll. Welche C-haltigen, aber N-freien Substanzen hier im einzelnen in Frage kommen, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, soweit uns nicht jetzt schon die Physiologie des Harns dafür gewisse Anhaltspunkte gibt (dextrinartige Körper usw.).

Ergebnisse.

1. Bei der Phlorrhizinvergiftung kommt es, abgesehen von der Ausscheidung reduzierender Substanzen nur ausnahmsweise noch zu einer pathologisch vermehrten Ausscheidung von dysoxydablem Kohlenstoff durch den Harn im Vergleich zur N-Ausscheidung, denn der Quotient C : N ist nach Abzug des in der reduzierenden Substanz enthaltenen C vom Gesamt-C des Harns nur ausnahmsweise erhöht. Bei dieser relativen Erhöhung des dysoxydablen Kohlenstoffs brauchen bei der Phlorrhizinvergiftung Ketonkörper keine Rolle zu spielen.

2. Abgesehen vom Gesamt-C bzw. dem Rest-C und dem Gesamt-N wird die Lage des Harnquotienten C : N bzw. Rest-C zu N nicht in gesetzmäßiger Weise beeinflußt durch den an einzelne Quoten des Harn-N gebundenen Kohlenstoff.

3. Es ist wahrscheinlich, daß bei der Gestaltung des Harnquotienten C : N durch den C-Gehalt des Harns auch C-haltige Harnsubstanzen eine Rolle spielen, die nicht an N gekoppelt sind.

4. Die Beweiskraft meiner zweiten und dritten Schlußfolgerung wird zwar dadurch eingeschränkt, daß ich mit dem Restquotienten im glycosurischen Harn operierte und diesen vielfach in Beziehung

m den Gesamtquotienten des aglykosurischen Harns setzte. Aber aus ler Arbeit von *Watanabe* (7) geht hervor, daß man zu prinzipiell den gleichen Schlußfolgerungen kommt, wenn man nur aglykosurische Harne unter sich vergleicht.

Literatur.

1) *Bickel* und *Kauffmann-Cosla*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 26. —) *Wada*, Medizinische Klinik 1926. — 3) *Grafe*, Die pathol. Phys. d. Gas-, Kraft- u. Stoffw. 1923. — 4) *Gottschalk*, diese Zeitschr. 155, 1925. —) *Gomez*, ebendaselbst 167, 1926. — 6) *Pincussen*, Mikromethodik. —) *Watanabe*, diese Zeitschr. 170, 432, 1926.

Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung des Harnquotienten C:N durch die perorale Gabe von Säuren, Alkalien und dem alkalischen Mineralwasser von Neuenahr.

Von

Makoto Watanabe (Osaka).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. Februar 1926.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

Es ist schon lange bekannt, daß durch die perorale Säure- und Alkalizufuhr der respiratorische Gaswechsel beeinflußt werden kann.

Nachdem von *Walter* (1) eingehend das Bild der Säureintoxikation beschrieben worden war, hat *Chvostek* (2) bei Kaninchen gefunden, daß bei Darreichung von Salzsäure in 0,2 bis 0,3proz. Lösung und bei Gaben bis zu 0,9 g pro Kilogramm die Oxydation und mit ihr die Wärmebildung abnahm. Etwa 6 Stunden nach der Vergiftung waren die Tiere bei diesen Versuchen gestorben. Bei der Zufuhr kleiner Säuremengen zum Körper, sei es auf peroralem, sei es auf intravenösem Wege, wurden dagegen Steigerungen der Oxydationen gesehen, nämlich von *Leimdörfer* (3) bei Kaninchen nach intravenöser Zufuhr von verdünnter saurer NaH_2PO_4-Lösung, ebenso wie auch *Raeder* (4) dasselbe bei gleicher Applikation saurer Salze fand. Auch *Atkinson* und *Lusk* (5) sahen bei Salzsäuregaben Gaswechselsteigerungen und *Waldbott* (6) fand in Versuchen am Menschen bei peroraler Salzsäuregabe das nämliche. Aus allen diesen Beobachtungen muß man schließen, daß bei Säurezufuhr zum Körper es bei kleinen Dosen zu einer Gaswechselerhöhung, bei größeren Dosen aber zu einer Gaswechselsenkung kommt. Die Alkaliwirkung auf den respiratorischen Gaswechsel wurde ebenfalls von verschiedenen Autoren studiert. *Warburg* (7) zeigte am befruchteten Strongylocentrotusei, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in einer weiten Konzentrationsbreite langsam mit der OH-Ionenkonzentration anstieg. *Grafe* (8) fand bei Vogelblutzellen unter der Wirkung von Ammoniak und Ammoniakderivaten mit zunehmender Basenkonzentration zunächst eine Steigerung, bei größeren Konzentrationen eine Hemmung der Oxydationen. Am höheren Tiere und am Menschen arbeiteten *Lehmann* (9), *A. Löwy* (10), *Leimdörfer* (3), *Raeder* (4), *Mäder* (11), *Bing* (12), *Waldbott* (6) u. a. Auch wurde der Einfluß von Alkaligaben auf den Gas-

wechsel bei Diabetikern untersucht. Eine kritische Übersicht über diese Literatur findet sich bei *Grafe* (8). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Alkalizufuhr zum Körper in kleinen Dosen eine Steigerung des Gaswechsels, in sehr großen Dosen aber eine Senkung desselben macht, und daß der Mensch bei richtiger Dosierung ebenfalls mit einer Steigerung der Oxydationen reagiert. Nur beim Diabetiker waren die Resultate der Versuche, wie aus der Arbeit von *Livierato* (13) hervorgeht, nicht eindeutig. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang noch, daß *Zuntz, Mäder, Misch* und *Bing* (14) in Versuchen am Menschen feststellten, daß die Anionen eine Vermehrung des O_2-Verbrauchs und eine Steigerung des respiratorischen Quotienten bewirken, während bei Kationen ein solcher Einfluß nicht nachweisbar war. Ferner sei hier darauf hingewiesen, daß *Staehelin* und *Maase* (15) fanden, ein Einfluß von 10 g Natriumbicarbonicum auf den Gaswechsel und Energieverbrauch beim Menschen erscheine während einer längeren Periode ausgeschlossen, und daß *A. Löwy* (10) nach der Gabe von 5 g Soda beim Menschen ebenfalls keinen Einfluß auf den Gaswechsel gesehen hat.

In dieses ganze Kapitel über die Beeinflussung der Oxydationen durch Säure oder Alkalizufuhr gehört auch die Frage über die Abhängigkeit der Oxydationen von einem mehr sauren oder mehr alkalischen Charakter der Nahrung. Hierzu hat neuerdings *Dürr* (16) eine Arbeit veröffentlicht. Dieser Autor fand, daß dann, wenn man den Menschen mehrere Tage lang auf eine an sauren Valenzen überreiche Kost setzt, die Oxydationsgröße, gemessen am Lungengaswechsel, bis maximal 14 Proz. ansteigt. Daß die saure Kost wirklich zu Verschiebungen des Säurebasengleichgewichts in diesen Versuchen geführt hatte, wurde an einem Absinken des Urin-p_H und der alveolaren Kohlensäurespannung, sowie an einer Zunahme der Ventilationsgröße der Lungen erkannt. Zulage von Ammonchlorid zu dieser Kost ließ die Oxydationen wieder absinken. In diesen Versuchen wurde die saure Kost nach den Vorschriften von *Beckmann* (17) gegeben.

Zusammenfassend läßt sich wohl sagen, daß den negativen Befunden bei Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit des respiratorischen Gaswechsels durch Alkalizufuhr so viel positive Beobachtungen über die Beeinflussungsmöglichkeit dieses Gaswechsels durch Alkalizufuhr gegenüberstehen, daß wir wohl damit rechnen dürfen, es führe die Alkalizufuhr zum Körper bei geeigneter Dosierung, d. h. bei mittleren Gaben eine Steigerung der Oxydationen, gemessen am Lungengaswechsel, herbei, und es ziehe die Säurezufuhr je nach der Dosierung eine Steigerung oder eine Herabsetzung des O_2-Verbrauchs nach sich. Nun hat aber *Grafe* (18) festgestellt, daß bei Gewebsschnitten nach der *Barcroft-Warburg*schen Methode bei wachsender H-Ionenkonzentration von p_H 6,5 bis p_H 9,5 keine Änderung der Oxydationsgröße eintrat. Daraus folgt, wie *Dürr* (16) meint, daß bei den Versuchen am ganzen Menschen und ganzen Tier die beobachteten Oxydationsänderungen nach der Säuregabe entweder vom Nervensystem ausgelöst werden, oder daß die Inkretstoffe innersekretorischer Drüsen im sauren Milieu anders wirken als im neutralen und alkalischen und dadurch Veränderungen des Gaswechsels hervorrufen.

Wie auch im einzelnen der Mechanismus der Gaswechselbeeinflussung im lebenden Körper durch Säure- oder Alkaligabe sein mag, ob es sich um direkte Wirkungen auf die Zellen oder um indirekte Wirkungen über das Nervensystem und die Inkretstoffe hin handeln mag, wir haben es jedenfalls in der Hand, durch die perorale Zufuhr größerer Säuregaben die Oxy-

dationen herabzusetzen, durch die perorale Zufuhr mittlerer Alkaligaben aber die Oxydationen anzufachen.

Nun haben *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (19) in ihrer Arbeit zur pathologischen Physiologie und Klinik der dysoxydativen Carbonurie, wie auch *Arnoldi* (20) kürzlich eingehend die Beziehungen des Lungengaswechsels zum Harnquotienten C : N auseinandergesetzt und gezeigt, daß vielfach eine Steigerung dieses Quotienten mit einer Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs, gemessen am Lungengaswechsel, konform geht und eine Senkung des Quotienten mit einer Steigerung dieses Sauerstoffverbrauchs, daß aber Änderungen in dem Quotienten auch ohne entsprechende Änderungen in dem Luftsauerstoffverbrauch erfolgen können. Dann zeigen aber häufig Veränderungen im respiratorischen Quotienten eine Oxydationsstörung an, die an dem Verhalten des Harnquotienten C : N einen noch feineren Ausdruck findet. Gerade im Hinblick auf diese Untersuchungen von *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* wie von *Arnoldi* war es von Interesse, das Verhalten des Harnquotienten C : N unter dem Eindruck der Säure und Alkaliwirkung zu studieren. Bestand hier jene eben geschilderte Relation, war bei der Säurevergiftung mit ihrer am Lungengaswechsel gefundenen Herabsetzung der Oxydation der Harnquotient C : N erhöht, und war er bei der Alkaligabe mit ihrer am Lungengaswechsel gefundenen Steigerung der Oxydation herabgesetzt, so war ein weiterer Beweis für die Bedeutung des Harnquotienten C : N als Indikator für die intermediären Oxydationsprozesse erbracht. Wenn ich bei meinen Versuchen keine Gaswechseluntersuchungen an den Tieren vornahm, sondern nur den Harnquotienten C : N bestimmte, so geschah das deshalb, weil es mir darauf ankam, zu ermitteln, ob überhaupt die vermuteten Quotientänderungen auftreten würden, und weil die Quotientänderungen auch allein schon des Studiums wert erschienen. Ferner wollte ich die Tiere — es handelte sich um Kaninchen —, um keine Störungen in der Quotientbildung herbeizuführen, auch nicht hungern lassen, wie das für Gaswechseluntersuchungen doch erforderlich ist.

Mit der Alkaliwirkung aber ist eng verknüpft die Wirkung von Trinkkuren mit alkalischen Mineralwässern, soweit diese zu der Behandlung von Stoffwechselkrankheiten, besonders des Diabetes herangezogen werden. Gerade hier war die klinische Empirie weit der exakten wissenschaftlichen Begründung der günstigen Wirkung dieser Trinkkuren beim Diabetes vorausgeeilt. Hatte doch *Külz* diese von *Segen* auf Grund seiner Erfahrungen in der Karlsbader Kurpraxis behauptete Wirkung im exakten klinischen Versuch nicht bestätigen können, und waren doch ähnliche klinische Experimentaluntersuchungen von *Kratschmer*, *Kretschy*, *Riess*, *Senator*, *Mering* u. a. — die Literatur findet sich in dem Lehrbuch der Balneotherapie von *Glax* (21) zusammengestellt — ebenfalls mit negativem Resultat verlaufen.

Paul Mayer (22) hatte indessen bei Kaninchen nach der Tränkung mit Karlsbader Wasser eine Senkung des Blutzuckers und eine Hemmung der alimentär erzeugten Hyperglykämie beobachten können und *Arnoldi* und *Roubitscheck* (23) (24) hatten auch beim Menschen einen gewissen, den Blutzucker herabsetzenden Einfluß nach der Gabe von Karlsbader Wasser in Fällen von Diabetes gesehen.

Die erste große klinische Experimentaluntersuchung über den Einfluß der Trinkkur mit einem alkalischen Mineralwasser auf den Verlauf des Diabetes beim Menschen, die einen positiven Erfolg hatte, wurde im Jahre 1913

von Maase und Salecker (25) *mit dem Neuenahrer Sprudel im Auftrage der Zentralstelle für Balneologie ausgeführt.* Als Maß für die Wirkung wurde die Größe der Zuckerausscheidung durch den Harn angenommen. Das Ergebnis dieser Arbeit war folgendes: „Die Neuenahrer Brunnenkur scheint auf die schwersten mit Acidose komplizierten Formen des Diabetes keinen wesentlichen Einfluß auszuüben. Auf schwere juvenile Diabetesformen kann sie sogar direkt ungünstig einwirken. Dagegen bildet die Kur ein wirksames Unterstützungsmittel in der Behandlung der mittelschweren und leichten Fälle. Wir glauben behaupten zu dürfen, daß selbst unter den günstigen Verhältnissen einer klinischen Behandlung gleiche Erfolge, namentlich in so kurzer Zeit nicht zu erzielen sind. Von besonderer Bedeutung erscheint uns die Tatsache, daß die Wirkung der Kur nicht mit ihrer Beendigung aufhört, sondern auch unter äußeren ungünstigen Verhältnissen sich über eine längere Zeit erstreckt."

Das war geschrieben vor der Entdeckung des Insulins. Aber so wie heute durch die Insulinbehandlung die diätetische Therapie beim Diabetes nicht überflüssig geworden ist, so wird auch die Balneotherapie gerade bei den leichten Diabetesfällen ihr Recht weiter behaupten.

Nun führt aber beim Diabetes die Stoffwechselstörung nicht nur zu einer Zuckerausscheidung, sondern auch nach *Alfthan*, *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (19) zu einer vermehrten Ausscheidung von anderem dysoxydablen Kohlenstoff im Harn, so daß selbst nach Abzug des im Zucker enthaltenen Kohlenstoffs noch der Quotient C : N, d. h. der Restquotient, wie er genannt wird, höher liegt als der Quotient C : N im normalen Harn. Auch die Ketonkörper sind an dieser Restquotientsteigerung im diabetischen Harn nicht schuld.

Gerade im Hinblick auf diese Verhältnisse beim Diabetes habe ich bei Kaninchen den Einfluß der Trinkkuren mit Neuenahrer Wasser auf den Quotienten C : N untersucht. Das Kaninchen schien deshalb besonders geeignet für diese Experimente, weil es unter physiologischen Verhältnissen bereits einen hohen Quotienten besitzt, weil es also in der Norm schon außerordentlich viel dysoxydablen Kohlenstoff im Verhältnis zum Stickstoff ausscheidet. *Wenn eine Beeinflussung dieses Harnquotienten im Sinne einer Erniedrigung durch eine Trinkkur mit dem Neuenahrer Sprudel herbeigeführt werden konnte, dann war damit die oxydationssteigernde Wirkung dieses Wassers am Kohlenstoff im intermediären Stoffwechsel dargetan,* was für die theoretische Erklärung seiner günstigen Wirkung auf die diabetische Glycosurie von größter Bedeutung schien. Außer mit dem Wasser wurden dann auch noch Versuche mit dem durch Abdampfen des Wassers erhaltenem Neuahrer Sprudelsalz vorgenommen.

Bei allen meinen Versuchen über die Einwirkung von Säure, Alkali und dem alkalischen Neuenahrer Mineralwasser bzw. Mineralwassersalz war die Versuchsanordnung prinzipiell die gleiche. Das betreffende Kaninchen wurde in einen Stoffwechselkäfig gesetzt und mit frischen Futterrüben ernährt. Es war dafür gesorgt worden, daß der Harn sich nicht mit Kot vermischen konnte. Der Harn wurde

von 24 zu 24 Stunden gesammelt, gemessen, und in der 24stündigen Harnmenge wurde der Stickstoff nach *Kjeldahl* und der Kohlenstoff nach der Methode der Verbrennung im flüssigen Medium bestimmt, wie sie ausführlich in der Arbeit von *Gomez* (26) beschrieben ist. Man muß bei der Sammlung des Harns, wie schon gesagt, Vorsorge treffen, daß der Harn keine Kotbeimengung erhält. Das wird erreicht, wenn man den Boden des Stoffwechselkäfigs mit einem engmaschigen Drahtnetz überzieht. Man muß natürlich für tägliche sorgfältige Reinigung des Käfigs und des Harnsammelgefäßes sorgen, damit nicht gröbere Zersetzungen in dem alkalischen Kaninchenharn während der 24stündigen Sammelzeit auftreten. Ins Gewicht fallende Änderungen im Kohlenstoffgehalt des zuckerfreien Kaninchenharns treten dann nicht auf. Selbst ein gewisses Bakterienwachstum in dem Harn während dieser Zeit ändert nichts Wesentliches an dem Kohlenstoffgehalt, weil wohl der aus dem Harn zum Bakterienwachstum entnommene Kohlenstoff wahrscheinlich in den Bakterienleibern deponiert wird. Folgender Versuch beweist das. Ich bestimmte in einem frisch gelassenen Kaninchenharn N und C sofort und ließ dann den Harn 24 Stunden bei Zimmertemperatur von etwa 18° C stehen und bestimmte darauf abermals den N- und C-Gehalt. Es zeigte sich, daß die Werte fast unverändert waren.

N	im frischen Harn	0,056 Proz.
C	,, ,, ,, ...	0,265 ,,
C : N	,, ,, ,, ...	4,732 ,,
N	24 Stunden später im gleichen Harn	0,056 ,,
C	24 ,, ,, ,, ,, ,,	0,261 ,,
C : N	24 ,, ,, ,, ,, ,,	4,661 ,,

Es wurde nun zunächst gewöhnlich 1 Woche lang täglich bei dem jeweiligen Versuchskaninchen N und C im Harn bestimmt, und der Quotient C : N berechnet. Dann erhielt das Tier etwa ebensolange täglich die perorale Gabe der Säure oder des Alkalis oder des Mineralwassers bzw. des Mineralwassersalzes. Mitunter wurde noch eine Nachperiode angeschlossen, in der die jeweilige Säure-, Alkali-, Mineralwasser- oder Salzzulage wieder in Wegfall kam, und die Ernährung wie in der Vorperiode gehandhabt ward. In anderen Fällen wurden auch an ein und demselben Kaninchen hintereinander mehrere Versuche mit verschiedenen Substanzen gemacht.

Die Analysenwerte in den Tabellen stellen die Durchschnittswerte von mindestens zwei gut übereinstimmenden Kontrollanalysen dar. Zwei gut übereinstimmende C-Analysen sind solche, bei denen die faktisch gewogene CO_2-Menge, die aus zwei 5 ccm-Portionen desselben Harns stammt, entweder überhaupt nicht differiert oder bis höchstens 2 Proz. differiert. Nur ganz ausnahmsweise ließen wir einmal bei

Doppelanalysen auch 4 Proz. Fehler gelten. Meiner Arbeit liegen etwa 500 Elementaranalysen des Kohlenstoffs und ebensoviel Stickstoffanalysen zugrunde.

a) Versuche mit Säure.

Bei den Säureversuchen erhielten die Kaninchen in Form einer n/10 Salzsäurelösung pro Kilogramm Körpergewicht 0,00473 bis 0,01160 g Salzsäure entweder bei gleichbleibender oder im Verlauf des Versuchs bei allmählich ansteigender Dosis täglich mit der Schlundsonde in den Magen eingegossen. Diese Mengen sind im Vergleich zu denjenigen, die *Chvostek* (2) bei seinen Versuchen gab, sehr gering; die Tiere von *Chvostek* starben aber auch sämtlich innerhalb von 6 Stunden nach der Säuregabe. Mir kam es darauf an, die Tiere möglichst lange und bei guter Nahrungsaufnahme am Leben zu erhalten und gröbere Störungen im Körpergewicht zu vermeiden, was auch gelang.

Kaninchen Nr.	Körpergewicht g	1/10 N.HCl pro Tag im Mittel ccm	HCl pro kg und Tag g	Harn-N im Mittel g	Harn-C im Mittel g	Im Durchschnitt im Vergleich zur Vorperiode Harn-N	Harn-C
I	2570	3,333	0,00473	0,9100	1,546	+ 0,219	+ 0,539
II 1	2120	3,666	0,00632	0,3620	0,668	— 0,141	— 0,112
II 2	2000	5,000	0,00913	0,2725	0,515	— 0,230	— 0,265
II 3	1887	6,000	0,01160	0,4617	0,985	— 0,041	+ 0,205

Aus der vorstehenden Zusammenstellung ergibt sich, daß unabhängig von der Größe der Säuregabe bei den beiden Kaninchen in dem einen Falle (Kaninchen II) eine leichte Verminderung, in dem anderen Falle (Kaninchen I) eine leichte Vermehrung des Harnstickstoffs auftrat. Da wir keine genaue Kenntnis über die Größe der N-Einfuhr mit der Nahrung haben, so kann man auch nicht sagen, ob unter dem Eindruck der Säurezufuhr etwa weniger Nahrung in dem einen Falle aufgenommen wurde, wodurch die Verminderung des Harn-N zu erklären wäre. In dem anderen Falle aber mit vermehrter N-Ausfuhr durch den Harn müßte dann, wenn man die gleiche Erklärung für die N-Differenz nähme, das Kaninchen in der Säureperiode mehr gefressen haben. So scheint es doch wahrscheinlicher zu sein, daß die Änderungen im Harn-N auf einer verschiedenen Größe des N-Umsatzes im Körper beruhen und mit Änderungen in der N-Aufnahme nichts zu tun haben. Die C-Ausscheidung unter der Salzsäuregabe verhielt sich nach der Tabelle derart, daß sie in ihren absoluten Werten ebensooft vermehrt wie vermindert wurde.

Mit einer Vermehrung oder Verminderung der C-Ausscheidung ging auch gewöhnlich eine entsprechende Änderung in der N-Ausscheidung einher, aber in einem Falle war bei Vermehrung der C-Ausscheidung die N-Ausscheidung vermindert.

In allen Fällen aber wurde in den Säureperioden im Vergleich zur Vorperiode relativ zum N mehr C ausgeschieden, und darum ging der Quotient C : N in die Höhe.

Diese Beobachtungen zeigen zugleich, daß die C-Ausscheidung gegenüber der N-Ausscheidung bei aller Abhängigkeit doch auch auf der anderen Seite eine große Selbständigkeit hat, daß die Produktion des dysoxydablen Harn-C nicht unbedingt von der Harn-N-Produktion abhängig ist.

b) Versuche mit Alkalien.

Bei den Alkaliversuchen erhielten die Kaninchen durchschnittlich entweder in Form einer n/10 Natronlaugelösung pro Tag und pro Kilogramm 0,008 g NaOH oder 0,01 g Na_2CO_3 oder Kalkwasser, bei dem die gewählte tägliche Dosis 0,0068 g $Ca(OH)_2$ pro Kilogramm Körpergewicht entsprach.

Bei den Alkaliversuchen blieb, wie bei den Säureversuchen, das Körpergewicht der Tiere ungefähr auf gleicher Höhe wie in der Vorperiode, manchmal zeigte sich eine leichte Verminderung desselben.

Kaninchen Nr.	Körpergewicht g	Alkaligabe pro kg und Tag g	Harn-N im Mittel g	Harn-C im Mittel g	Im Durchschnitt im Vergleich zur Vorperiode Harn-N	Harn-C
II	1900	0,01115 Na_2CO_3	0,328	0,593	— 0,175	— 0,187
III	1758	0,00835 NaOH	0,427	0,715	+ 0,225	+ 0,121
IV	1833	0,00801 NaOH	0,483	0,748	+ 0,069	+ 0,116
IV	1900	0,00681 $Ca(OH)_2$	0,540	0,964	+ 0,057	+ 0,120

Die Stickstoffausscheidung zeigte während der Alkaligabe im Vergleich zur Vorperiode in der Mehrzahl der Fälle eine Vermehrung, die aber nicht mit der Größe der Alkaligabe parallel ging. In einem Falle war sogar eine Verminderung des Harn-N vorhanden.

Der Harn-C zeigte in drei Fällen eine Vermehrung, in einem Falle eine Verminderung in seinen absoluten Werten.

Im allgemeinen ging bei den Alkaliversuchen die Verminderung oder Vermehrung des Harn-N mit entsprechenden Änderungen im Harn-C konform. *In allen Fällen war unter dem Eiufluß der Alkaligabe der Harn-C im Vergleich zum Harn-N vermindert, so daß der Quotient C : N erniedrigt war.*

Hinsichtlich der N-Ausfuhr ergab sich bei meinen Versuchen dasselbe, was *Löwi* (27) zusammenfassend zu dieser Frage im *v. Noorden*schen Handbuch geschrieben hat, nämlich daß bei kleinen und mittleren Gaben von Säuren, Alkalien und Salzen Einwirkungen auf den N-Umsatz fehlen oder gering sind.

c) Versuche mit dem Neuenahrer Sprudel und Sprudelsalz.

Bei den Mineralwasserversuchen erhielten die Kaninchen an verschiedenen Tagen pro Kilogramm und pro Tag etwa 5 bis 10 ccm Neuenahrer Wasser, durchschnittlich in den ganzen Perioden aber 6 bis 26 ccm. Vom Mineralwassersalz bekamen sie 0,03 bis 0,07 g pro Kilogramm und Tag. Das Körpergewicht der Tiere, mit Ausnahme des an einer Lungentuberkulose, wie die spätere Sektion ergab, erkrankten Tieres Nr. VI, das progressiv an Gewicht abgenommen hatte, blieb ziemlich konstant.

Kaninchen Nr.	Körpergewicht g	Wasser bzw. Salzgabe pro kg u. Tag in ccm bzw. g	Harn-N im Mittel g	Harn-C im Mittel g	Im Durchschnitt im Vergleich zur Vorperiode Harn-N	Harn-C
VI	1838	40,0 ccm	1,080	1,118	+ 0,940	+ 0,135
IX	1900	11,0 ccm	0,537	0,728	— 0,377	— 0,841
VIII	1887	26,5 ccm	1,409	1,757	+ 0,466	+ 0,252
VII	1770	0,034 g	0,651	0,746	+ 0,092	— 0,018
X	1466	0,068 g	0,571	0,978	+ 0,118	— 0,282

Bei diesen Mineralwasserversuchen bzw. Mineralwassersalzversuchen nahm in der Regel die Stickstoffausscheidung im Harn zu, nur einmal war sie vermindert, dagegen nahmen die absoluten Werte für den Harn-C in der Mehrzahl der Fälle ab, nur zweimal zu. Ferner wurde in zwei Fällen bei Zunahme der N-Ausfuhr eine Abnahme der C-Ausfuhr durch den Harn beobachtet.

Die Zunahme der N-Ausfuhr als gewöhnliche Folge haben wir sowohl bei den Alkaliversuchen, wie auch bei den Mineralwasser- bzw. Salzversuchen gesehen. Dagegen war das Überwiegen in der Abnahme der C-Ausfuhr nur bei den Mineralwasser- bzw. Salzversuchen vorhanden.

Bei den Säureversuchen war im Gegensatz zu alledem gewöhnlich die N-Ausfuhr herabgesetzt, und die C-Ausfuhr verhielt sich stark schwankend. *So sehen wir, daß gerade durch die Gabe des Neuenahrer Mineralwassers bzw. des Neuenahrer Mineralwassersalzes in den gewählten und auch beim diabetischen Menschen üblichen Dosen von etwa 15 bis 20 ccm Mineralwasser pro Kilogramm und Tag in ganz besonders sinnfälliger Weise, trotz Vermehrung der N-Ausscheidung die Ausscheidung des dysoxydablen C durch den Harn schon in ihren absoluten Werten herabgesetzt wird. In allen Fällen aber wird der Quotient C : N im Harn unter der Mineralwasser- bzw. Salzwirkung vermindert, also in allen Fällen relativ zum N weniger C ausgeschieden.* Prinzipiell gehen also die Versuche mit dem Neuenahrer Mineralwasser bzw. Mineralwassersalz konform mit den Alkaliversuchen.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Die bisher mitgeteilten Versuche lehrten, daß trotz aller inneren abhängigen Beziehungen zwischen der Größe der N-Oxydation und derjenigen der C-Oxydation dennoch beide auch im gewissen Umfang ihre selbständigen Wege gehen. Ein namhafter Teil des dysoxydablen C hat demnach, worauf auch schon von anderer Seite früher in der Literatur hingewiesen wurde, wahrscheinlich auch andere Quellen als das Eiweiß; da wird man vor allen Dingen an das Kohlehydrat denken müssen. Die Gründe, die dafür sprechen, haben erst neuerdings *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (19) in ihrer Arbeit zur dysoxydativen Carbonnorie auseinandergesetzt.

Die Steigerung des Quotienten bei meinen Säureversuchen muß also auf eine im Vergleich zum N mangelhafte Oxydation des Kohlenstoffs zu beziehen sein, und da wird man wieder vor allem an den Kohlehydrat-C denken müssen. Bei den Säureversuchen wurde sogar im allgemeinen der N-Umsatz eingeschränkt. Die Ausscheidung von dysoxydablem Kohlenstoff aber erfuhr keine entsprechende Einschränkung, manchmal sogar eine absolute Steigerung, jedenfalls immer eine relative Steigerung zur N-Ausfuhr. Die Säuremengen, die ich bei meinen Versuchen gab, haben also einmal in den meisten Fällen zu einer Hemmung in der Stickstoffoxydation geführt, weil die N-Ausscheidung abnahm, aber auch zu einer Hemmung der Kohlenstoffoxydation, weil die Ausscheidung des dysoxydablen Kohlenstoffs in manchen Fällen absolut zunahm, immer aber im Vergleich zum Harn-N gesteigert war, so daß also regelmäßig C im Vergleich zum N weniger als in der Norm zu CO_2 oxydiert und exhaliert wurde, sondern mehr in der Form komplizierterer C-Verbindungen durch den Harn zur Ausscheidung gelangte. Diese Feststellung über die Einschränkung der Oxydation am Kohlenstoff im Hinblick auf eine restlose Durchführung der Oxydation an der jeweiligen Substanzmasse könnte aber von einer ver-

mehrten Heranziehung von Substanz zur Oxydation überhaupt gefolgt sein. Es könnte der Körper das Bestreben haben, die qualitativ schlechte Oxydation am einzelnen Molekül auszugleichen durch die Heranziehung von mehr Molekülen zu dieser schlechten Oxydation. Dann könnte der Luftsauerstoffverbrauch wegen einer überkompensatorischen Heranziehung einer größeren Menge von Molekülen vergrößert sein bei qualitativ schlechter Durchführung der Oxydation am einzelnen Molekül. Am Gaswechsel könnte sich also bei den doch zweifellos kleinen Säuregaben, die ich bei meinen Versuchen wählte, sehr wohl eine Steigerung des Luft-O_2-Verbrauchs zeigen trotz Vorhandenseins der dysoxydativen Störung, wie sie die Harnuntersuchung aufweist. Eine Steigerung der Oxydatien bei kleinen und mittleren, nicht toxischen Säuregaben ist ja auch am Gaswechsel von den verschiedensten Autoren gefunden worden. Daß bei einer so schweren Säurevergiftung, die schon zu einer am Lungengaswechsel erkennbaren Herabsetzung im O_2-Verbrauch führt, erst recht eine dysoxydative Störung am Harn nachweisbar sein wird mit Erhöhung des Quotienten C : N, das ist wohl sicher anzunehmen.

Bei meinen Alkaliversuchen liegt die Sache einfacher. Steigerung des Lungengaswechsels als Folge der Alkalizufuhr zum Körper, und zwar bei therapeutisch überhaupt in Frage kommenden Dosen ist mehrfach, wie aus meiner einleitenden Literaturübersicht hervorgeht, beobachtet worden. Manchmal aber wurde auch kein Einfluß des Alkalis auf den Lungengaswechsel gesehen. Aus meinen Versuchen, die die Senkung des Harnquotienten C : N während der Alkaligabe und bei bestimmten Dosierungen zeigen, ergibt sich, daß im Vergleich zum Stickstoff unter der Alkaliwirkung größere Mengen von Kohlenstoff eine gründlichere Durchoxydation erfahren als in der Norm. Diese vollständigere Oxydation an einzelnen Molekülen könnte aber in manchen Fällen gefolgt sein von einer kompensatorischen oder überkompensatorischen Einschränkung in der der Oxydation anheimfallenden Molekülzahl überhaupt. Dann könnten entweder die Veränderungen am Gaswechsel nur unbedeutend sein oder auch ganz ausbleiben, und es ließe sich so vielleicht erklären, warum in manchen Versuchen nach der Alkalizufuhr eine Steigerung des Gaswechsels gefunden, in anderen sie vermißt wurde.

Die Quotientsenkung bei der Alkaliwirkung kommt vor allem durch die größere Stickstoffausscheidung, also durch die gesteigerte Eiweißoxydation zustande. Hand in Hand damit geht auch offenbar eine Steigerung im Umsatz der N-freien Kohlenstoffverbindungen, so daß auch die Harnschlacken dieser Verbindungen, d. h. der dysoxydable C in der Regel absolut vermehrt ist. Aber bei dieser Steigerung des Gesamtumsatzes fällt doch relativ weniger dysoxydabler C bei der Alkaligabe ab, als ohne dieselbe.

Jedenfalls ist das Wesentliche der Alkaliwirkung die Verbesserung der Oxydation, d. h. die vollständigere Durchoxydierung einzelner Moleküle bei einem quantitativ vermehrten Umsatz an Material. Hierin steht die Alkaliwirkung in schroffem Gegensatz zur Säurewirkung. Die Alkaliwirkung führt im Vergleich zum N zu einer geringeren Ausscheidung an dysoxydablem C, die Säurewirkung aber zu einer vermehrten Ausscheidung dieses C im Verhältnis zum N.

Prinzipiell in der gleichen Weise wie die Alkaliversuche verliefen die mit dem Neuenahrer Sprudel und dem Neuenahrer Sprudelsalz.

Anhang I.

Einige Beobachtungen über die Beeinflussung der Ausscheidung reduzierender und optisch aktiver Substanzen durch den Harn bei einer Trinkkur mit dem Neuenahrer Sprudel.

Die erste Beobachtung betrifft einen 9 kg schweren Hund, der einige Zeit täglich Phlorrhizininjektionen erhalten hatte, und bei dem nach Aufhören mit diesen Injektionen der Harn noch weiter hin die *Fehling*sche Lösung reduzierte und bei der polarimetrischen Untersuchung links drehte. Um die Ausscheidung welcher reduzierenden und linksdrehenden Substanz es sich handelte — die Substanz war überhaupt nur in geringen Mengen in dem Harn vorhanden —, konnte bei den kleinen zur Verfügung stehenden Mengen nicht genau bestimmt werden. Dieses 9 kg schwere Tier erhielt während der ganzen Versuchsdauer täglich das gleiche Nahrungsquantum: 250 g Pferdefleisch, 40 g Reis, 20 g Schmalz, 2 g Salzgemisch.

Nachdem bei diesem Tiere der eben geschilderte Harnbefund in der 24stündigen Harnmenge nach dem Aussetzen der Phlorrhizinbehandlung mit großer Regelmäßigkeit und Gleichförmigkeit 8 Tage lang beobachtet worden war, bekam es während 2 Tage je 500 ccm Neuenahrer Wasser durch die Schlundsonde in den Magen eingegossen.

In der 24stündigen Harnmenge war an diesen Tagen die Reduktionsprobe negativ und der Harn verhielt sich optisch inaktiv. Der Harnquotient C : N, der auch in der Periode vor der Wassergabe schon normal gewesen war trotz der Anwesenheit der geringfügigen Menge reduzierender und linksdrehender Substanz wurde in seinem Werte nicht verändert. Als nun an den folgenden 2 Tagen das Tier kein Mineralwasser mehr bekam, trat sofort wieder die linksdrehende und reduzierende Substanz im Harn auf. Der Quotient änderte sich nicht wesentlich. Als jetzt wieder 3 Tage lang je 500 ccm Neuenahrer Wasser dem Tiere gegeben wurden, verschwand bei einem gleichbleibenden Quotienten C : N die reduzierende und linksdrehende Substanz abermals prompt aus dem Harn.

Als mit der Mineralwasserbehandlung wieder aufgehört wurde, zeigte der Harn auch wieder sein altes pathologisches Verhalten.

Dieser Versuch zeigt, daß durch das Neuenahrer Mineralwasser eine, wenn auch nicht genauer in dem voliegenden Falle definierte, doch zweifellos vorhandene dysoxydative Störung prompt beseitigt werden kann.

Die zweite hierher gehörige Beobachtung betrifft eine fettleibige Patientin im Alter von 48 Jahren, die seit etwa 2 Jahren an einem leichten Diabetes erkrankt war. Sie stand seit etwa einem Jahre unter einem antidiabetischen Diätregime (Fetteiweißkost). Anfang September 1925 war der Zucker verschwunden, d. h. der Harn war optisch inaktiv und reduzierte nicht mehr die *Fehling*sche Lösung. Die Aceton- und Acetessigsäurereaktion im Harn war negativ. Der Harnquotient C : N betrug Anfang September 1925: 0,93, wohlgemerkt ohne gleichzeitige Zuckerausscheidung im Harn und bei vornehmlicher Fetteiweißkost.

Dieser Quotient von 0,93 bei der genannten Kost ist ganz zweifellos pathologisch erhöht. In der Norm wird ein solcher Quotient im allgemeinen bekanntlich nur bei einer sehr N-armen und kohlehydratreichen Kost erzielt. Wir haben es also bei dieser Patientin mit einer Diabetikerin zu tun, bei der sich die diabetische Stoffwechselstörung am Harn nur noch in einem erhöhten Quotienten ohne gleichzeitige Glykosurie und Ketonurie offenbarte. Dieser Fall ist zugleich auch ein Beweis für die Richtigkeit der Behauptung von *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (19), daß

die diabetische Stoffwechselstörung auch, abgesehen von der Glykosurie und Ketonurie, noch zu einer anderweitig bedingten dysoxydativen Carbonurie führe. In reiner Form sehen wir diese Störung bei unserer Patientin.

Am 27. November 1925 hatte sich bei der Patientin wieder eine Glykosurie eingestellt. Sie schied etwa 6,0 g Zucker pro Tag aus. Der Gesamtquotient C : N im Harn betrug am 27. und 30. November 1,12 bzw. 1,36. Wenn man von dem Gesamt-C den aus dem Polarisationswert für den Zucker berechneten Zucker-C abzog und mit diesem Rest-C und dem Gesamt-N den Restquotienten C : N ermittelte, ergaben sich die Werte 0,91 bzw. 1,18. Man sieht, daß dieser Restquotient mit dem Gesamtquotienten von 0,93 konform geht, den die Patientin im September zu einer Zeit hatte, als keine Glykosurie bestand. Weder damals noch jetzt war Ketonurie vorhanden.

Vom 2. bis 9. November 1925 bekam nun die Patientin bei im übrigen gleicher Diät 250 ccm Neuenahrer Sprudel zu trinken. Die Rechtsdrehung des Urins verschwand prompt schon am ersten Mineralwassertage und machte einer schwachen Linksdrehung Platz. Die genauere Untersuchung ergab die Möglichkeit der Anwesenheit geringer Glykuronsäuremengen. Der Harnquotient C : N bei Berechnung mit dem gesamten C-Wert des Harns, also auch einschließlich des in der linksdrehenden Substanz enthaltenen C ging während der Mineralwassergabe langsam zurück. Er sank von 1,08 am ersten Mineralwassertage auf 0,89 am vierten Tage und stieg wieder auf 1,06 am sechsten Mineralwassertage. Der Quotient hatte also nach dem Verschwinden des rechtsdrehenden Zuckers durchschnittlich den Wert von 1,00, während er in der Vorperiode mit dem Zucker den Quotienten 1,24 und nach Abzug des Zucker-C den Wert von 1,04 gezeigt hatte. Der Gesamtquotient in der Mineralwasserperiode entsprach also in seiner Größe dem Restquotienten in der Vorperiode.

Nach dem Aussetzen der Mineralwassergabe trat sofort wieder, und zwar schon am ersten Tage der rechtsdrehende Zucker im Harn auf, der Gesamtquotient aber blieb an den beiden Tagen mit 0,99 und 1,02 trotzdem auf der gleichen Höhe.

Aus dieser Beobachtung an der diabetischen Patientin ergibt sich, daß unter dem Einfluß einer Trinkkur mit dem Neuenahrer Sprudel bei leichtem Diabetes und bei im übrigen gleicher Diät der rechtsdrehende Zucker prompt aus dem Harn verschwinden kann, was auch schon *Maase* und *Salecker* gefunden hatten.

Anhang II.

Einige Beobachtungen über den Gehalt des Harns an Ammoniak und Harnstoff bei verschiedener Lage des Quotienten C : N an demselben Tiere.

Wie aus meinen Versuchsprotokollen sich ergibt, habe ich in einigen Fällen, nämlich bei den Kaninchen II und IV, außer dem N und C auch das Ammoniak und den Harnstoff im Harn bestimmt. Ich wollte nachsehen, ob mit Erhöhungen oder Senkungen des Quotienten oder auch bei gleichen Quotienten in verschiedenen Perioden in den Periodendurchschnitten, die den jeweiligen Quotientberechnungen zugrunde liegen, die Ammoniak- und Harnstoffwerte in irgend einer gesetzmäßigen Beziehung zu der Lage der Quotienten stehen. Es hat sich herausgestellt, daß das nicht der Fall ist. Bei dem Kaninchen II z. B. ging mit einer Senkung des Quotienten bald eine Verminderung, bald eine Vermehrung der Ammoniak- und Harnstoffausscheidung einher. Auch bei einer Steigerung des Quotienten verhielt sich

das Ammoniak verschieden, der Harnstoffgehalt war zweimal vermehrt. Ja selbst bei gleichbleibenden Quotienten kann zu verschiedenen Zeiten eine verschiedene Harnstoffmenge ausgeschieden werden. Alle diese Beobachtungen beweisen, daß die Verteilung der einzelnen, von mir untersuchten N-haltigen Substanzen im Harn keinen bestimmenden Einfluß auf die Lage des Quotienten hat.

Anhang III.

Methodik.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt. Der Kohlenstoff wurde nach der Methode der Verbrennung im flüssigen Medium bestimmt, wie sie in der Arbeit von *Gomez* (26) ausführlich beschrieben ist. Der Harnstoff wurde nach der Ureasemethode und das Ammoniak wurde in der üblichen Weise nach der Destillationsmethode bestimmt. Ich hielt mich an die Vorschriften von *Pincussen* (Mikromethodik 1923, S. 21 und 24).

Ergebnisse.

1. Bei 24stündigem Stehen des alkalischen zuckerfreien Kaninchenharns bei Zimmertemperatur von etwa 18° C ändert sich der N- und C-Gehalt des Harns und damit auch der Harnquotient C : N praktisch nicht.

2. Bei mehrtägiger peroraler Zufuhr von 0,004 bis 0,01 g Salzsäure pro Kilogramm Körpergewicht und pro Tag erhöht sich der Harnquotient C : N bei Kaninchen.

3. Bei mehrtägiger peroraler Zufuhr von 0,01 g Na_2CO_3 oder 0,008 g NaOH oder 0,007 g $Ca(OH)_2$ pro Kilogramm Körpergewicht und pro Tag senkt sich der Harnquotient bei Kaninchen.

4. Bei mehrtägiger peroraler Zufuhr von 11 bis 40 ccm Neuenahrer Sprudel oder von 0,3 bis 0,7 g Neuenahrer Sprudelsalz pro Kilogramm Körpergewicht und pro Tag senkt sich der Harnquotient bei Kaninchen.

5. Bei mehrtägiger peroraler Zufuhr von Neuenahrer Sprudel verschwand aus dem Harn eines kranken Hundes eine linksdrehende, reduzierende Substanz, und in einem Falle eines leichten Diabetes beim Menschen wurde die Rechtsdrehung des Harns in eine Linksdrehung verwandelt.

6. Bei einem leichten Falle von Diabetes ließ sich nachweisen, daß auch zu Zeiten, in denen keine Glykosurie und keine Ketonurie bestand, trotz einer vornehmlichen Fett-Eiweißkost der Harnquotient C : N pathologisch erhöht war.

7. Da die Erhöhung des Harnquotienten C : N eine Verschlechterung der Kohlenstoffoxydation im Körper im Vergleich zur Stickstoffoxydation anzeigt, und da die Senkung dieses Quotienten das Umgekehrte, nämlich die Verbesserung der Kohlenstoffoxydation im intermediären Stoffwechsel beweist, so zeigen alle diese Versuche an:

a) daß schon durch kleine Säuregaben die Oxydation am Kohlenstoff beeinträchtigt wird, wenn auch diese Störung am Lungengaswechsel aus den früher dargelegten Gründen nicht zur Beobachtung kommt;

b) daß durch kleine Alkaligaben die Oxydation am Kohlenstoff begünstigt wird, wie es auch die Lungengaswechseluntersuchung zeigt;

c) daß durch die Gabe des Neuenahrer Sprudels in den therapeutisch in Frage kommenden Mengen, wie auch durch die Gabe de Neuenahrer Sprudelsalzes die Oxydation am Kohlenstoff eine Förderun

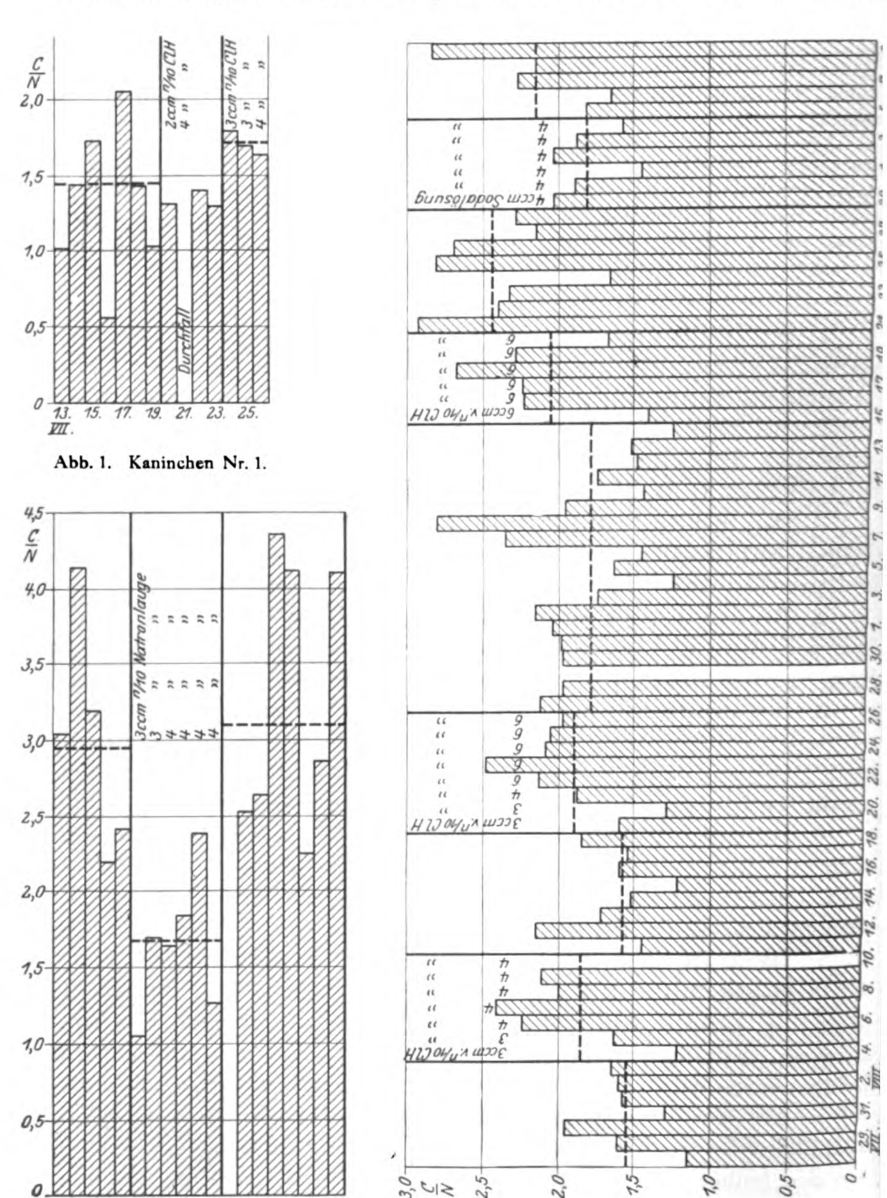


Abb. 1. Kaninchen Nr. 1.

Abb. 3 Kaninchen Nr. 3.

erfährt, wodurch sich die therapeutisch günstige Wirkung dieses Mineralwassers beim Diabetes mellitus erklärt.

In den Kurven werden die Versuchsergebnisse graphisch veranschaulicht. Auf allen Kurven bezeichnet die Höhe der einzelnen Säulen die Höhe des Harnquotienten C : N an den einzelnen Versuchstagen einer Periode. Die durchgezogene Querlinie bezeichnet die durchschnittliche Lage des Quotienten in der betreffenden Versuchsperiode.

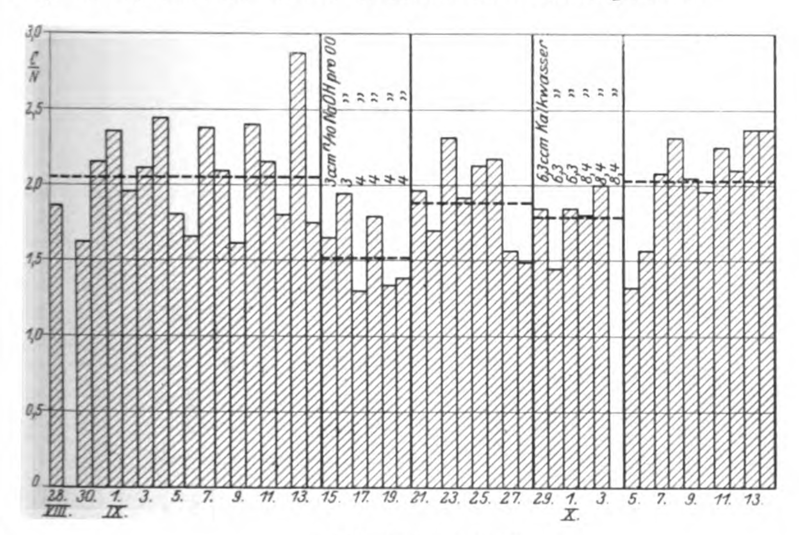


Abb. 4. Kaninchen Nr. 4.

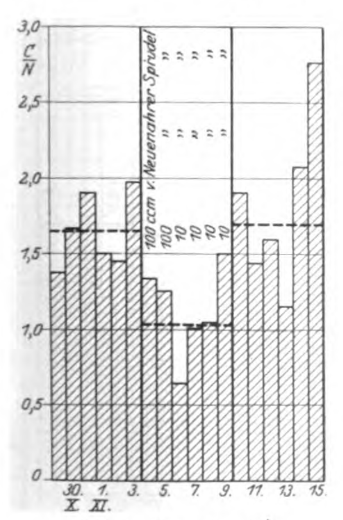


Abb. 5. Kaninchen Nr. 6.

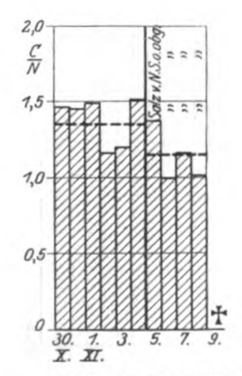


Abb. 6. Kaninchen Nr. 7.
0,1 proz. Wasseremulsion des Sprudelsalzes.

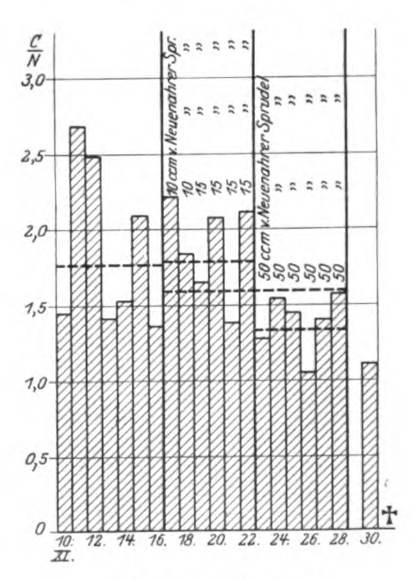


Abb. 7. Kaninchen Nr. 8.

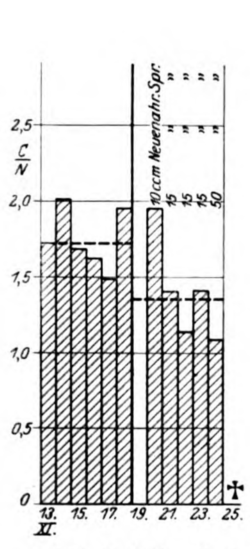


Abb. 8. Kaninchen Nr. 9.

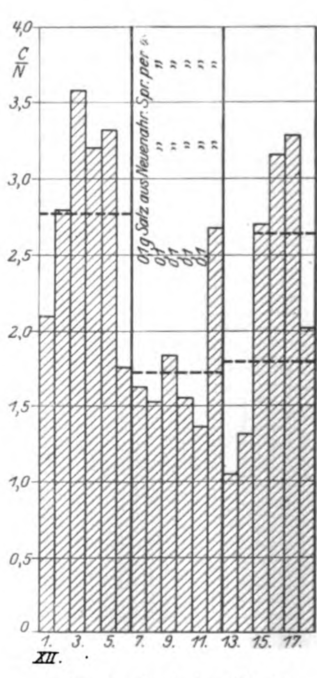


Abb. 9. Kaninchen Nr. 10.

Kaninchen Nr. 1.

Datum	Körpergewicht	Harnmenge	N im Harn	Gesamt-N in der Periode	Durchschnittswert von N	C im Harn	Gesamt-C in der Periode	Durchschnittswert von C	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g			
12.VII.	2600	435	0,49			—			—		
13.VII.	2600	355	0,60			0,61			1,01		
14.VII.	2600	485	0,68			0,98			1,44		
15.VII.	2600	585	0,98	4,840	0,691	1,70	7,05	1,007	1,73	*1,457*	
16.VII.	2600	385	0,22			0,12			0,55		
17.VII.	2600	485	0,81			1,66			2,05		
18.VII.	2600	495	0,97			1,39			1,43		
19.VII.	2700	260	0,58			0,59			1,02		
20.VII.	2600	475	0,79			1,03			1,31		2 ccm n/10 Salzsäure } auf 28 ccm Wasser per os gegeben.
21.VII.	—	Durchfall				—			—		4 ccm n/10 Salzsäure } auf 28 ccm Wasser per os gegeben.
22.VII.	2650	335	0,94			1,32			1,40		
23.VII.	2650	255	0,79			1,02			1,29		
24.VII.	2550	328	0,92			1,64			1,78		3 ccm n/10 Salzsäure } auf 30 ccm Wasser per os gegeben.
25.VII.	2650	205	0,86	2,73	0,910	1,45	4,640	1,547	1,69	*1,700*	3 ccm n/10 Salzsäure } auf 30 ccm Wasser per os gegeben.
26.VII.	2550	340	0,95			1,55			1,63		4 ccm n/10 Salzsäure } auf 30 ccm Wasser per os gegeben.

Wegen Durchfall Versuch abgebrochen.

Kaninchen Nr. 2.

Datum	Körpergewicht	Harnmenge	N im Harn	Gesamt-N in der Periode	Durchschnittswert von N	C im Harn	Gesamt-C in der Periode	Durchschnittswert von C	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnittswert von Ammoniak in der Periode	Durchschnittswert von Harnstoff in der Periode	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g	g		g	g	
28. VII.	2300	170	0,57			0,66			1,16				
29. VII.	2250	450	0,76			1,22			1,61				
30. VII.	2250	250	0,46			0,90			1,96				
31. VII.	2300	180	0,35	3,520	0,503	0,45	5,46	0,780	1,29	*1,551*			
1.VIII.	2150	235	0,49			0,78			1,57				
2.VIII.	2100	132	0,20			0,32			1,60				
3.VIII.	2150	248	0,69			1,13			1,64				

Kaninchen Nr. 2 (Fortsetzung).

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C:N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnittswert von Ammoniak in der Periode g	Durchschnittswert von Harnstoff in der Periode g	Bemerkungen
4.VIII.	2120	275	0,46			0,56			1,22				3 ccm n/10 Salzsäure (auf 30 ccm Wass. per os gegeben)
5.VIII.	2100	230	0,56			0,91			1,63				3 „ n/10 „
6.VIII.	2150	260	0,21			0,47			2,24				4 „ n/10 „
7.VIII.	2100	298	0,32	2,170	0,362	0,77	4,01	0,668	2,41	*1,848*	0,2083		4 „ n/10 „
8.VIII.	2100	95	0,09			0,18			2,00				4 „ n/10 „
9.VIII.	2150	380	0,53			1,12			2,11				4 „ n/10 „
10.VIII.	—	—	—			—			—				
11.VIII.	2050	280	0,57			0,82			1,44				
12.VIII.	2100	70	0,26			0,56			2,15				
13.VIII.	2100	190	0,32			0,55			1,72				
14.VIII.	2100	230	0,52	3,05	0,381	0,79	4,83	0,604	1,52	*1,584*	0,2500	0,1918	
15.VIII.	2050	235	0,33			0,37			1,12				
16.VIII.	2050	245	0,48			0,77			1,60				
17.VIII.	2000	202	0,28			0,43			1,54				
18.VIII.	2000	128	0,29			0,54			1,86				
19.VIII.	2000	180	0,15			0,24			1,60				3 ccm n/10 Salzsäure (auf 30 ccm Wasser per os gegeben)
20.VIII.	2000	245	0,45			0,58			1,29				3 „ n/10 „
21.VIII.	2000	225	0,25			0,47			1,88				4 „ n/10 „
22.VIII.	1950	275	0,31	2,18	0,272	0,66	4,12	0,515	2,13	*1,890*	0,2103		6 „ n/10 „
23.VIII.	1950	245	0,21			0,52			2,48				6 „ n/10 „
24.VIII.	2000	200	0,22			0,46			2,09				6 „ n/10 „
25.VIII.	2000	260	0,33			0,68			2,06				6 „ n/10 „
26.VIII.	2000	205	0,26			0,51			1,97				6 „ n/10 „
27.VIII.	2000	350	0,49			1,04			2,12				
28.VIII.	2000	225	0,31			0,61			1,97				
29.VIII.	1940	270	—			—			—				
30.VIII.	1930	222	0,34			0,67			1,97				
31.VIII.	1950	200	0,47			0,93			1,98				

Kaninchen Nr. 2 (Fortsetzung).

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C:N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnittswert von Ammoniak in der Periode g	Durchschnittswert von Harnstoff in der Periode g	Bemerkungen
1. IX.	1950	325	0,45			0,92			2,04				
2. IX.	1910	201	0,25			0,54			2,16				
3. IX.	1940	248	0,42			0,73			1,74				
4. IX.	1930	242	0,41	7,25	0,4028	0,51	12,88	0,716	1,24	*1,777*	0,2222	0,3543	
5. IX.	1900	225	0,38			0,62			1,63				
6. IX.	1870	130	0,51			0,74			1,45				
7. IX.	1880	208	0,25			0,59			2,36				
8. IX.	1880	220	0,37			1,04			2,81				
9. IX.	1880	225	0,25			0,49			1,96				
10. IX.	1880	235	0,46			0,66			1,43				
11. IX.	1820	205	0,40			0,70			1,75				
12. IX.	1845	205	0,37			0,54			1,48				
13. IX.	1860	292	0,57			0,86			1,51				
14. IX.	1820	220	0,55			0,69			1,25				
15. IX.	1830	162	0,54			0,76			1,41				6 ccm n/10 Salzsäure
16. IX.	1860	335	0,52			1,16			2,23				6 „ n/10 „
17. IX.	1810	330	0,42	2,77	0,4617	0,94	5,71	0,9850	2,24	*2,061*	0,2087	0,4939	6 „ n/10 „
18. IX.	1810	290	0,28			0,75			2,68				6 „ n/10 „
19. IX.	1830	605	0,68			1,55			2,28				6 „ n/10 „
20. IX.	1830	215	0,33			0,55			1,67				6 „ n/10 „ } auf 60 ccm Wass. auf 2 mal per os
21. IX.	1860	410	0,75			2,20			2,93				
22. IX.	1870	285	0,40			0,96			2,40				
23. IX.	1870	370	0,52			1,21			2,33				
24. IX.	1885	260	0,29	3,49	0,4363	0,48	8,53	1,0663	1,66	*2,444*	0,2125	0,3099	
25. IX.	1950	142	0,16			0,45			2,81				
26. IX.	1880	320	0,45			1,21			2,69				
27. IX.	1900	360	0,60			1,29			2,15				
28. IX.	1880	330	0,32			0,73			2,28				

Kaninchen Nr. 2 (Fortsetzung).

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C:N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnittswert von Ammoniak in der Periode g	Durchschnittswert von Harnstoff in der Periode g	Bemerkungen
29. IX.	1900	270	0,34			0,69			2,03				4 ccm von Sodalösung*) per os gegeben (29. IX.–4. X.)
30. IX.	1900	400	0,45			0,85			1,89				
1. X.	1900	224	0,31	1,97	0,328	0,45	3,56	0,593	1,45	*1,808*	0,0396	0,1324	
2. X.	1880	220	0,28			0,57			2,04				
3. X.	1910	170	0,24			0,45			1,88				
4. X.	1910	195	0,35			0,55			1,57				
5. X.	1910	225	0,38			0,69			1,82				
6. X.	1900	235	0,43			0,71			1,65				
7. X.	1830	240	0,37	1,87	0,354	0,84	4,01	0,802	2,27	*2,144*	0,1295	0,2048	
8. X.	1900	194	0,27			0,58			2,15				
9. X.	1900	270	0,42			1,19			2,83				

*) 5,3 g Na_2CO_3 in 1 Liter H_2O gelöst (entspricht einer n/10 NaOH-Lösung).

Kaninchen Nr. 3.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C:N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnittswert von Ammoniak in der Periode g	Bemerkungen
30. VII.	1950	175	0,25			0,76			3,04			
31. VII.	1950	160	0,14			0,58			4,14			
1. VIII.	1900	190	0,21	1,01	0,202	0,67	2,97	0,594	3,19	*2,941*		
2. VIII.	1800	140	0,15			0,33			2,20			
3. VIII.	1800	185	0,26			0,63			2,42			
4. VIII.	1750	100	0,25			0,26			1,04			3 ccm n/10 Salzsäure auf 27 ccm Wasser per os gegeben
5. VIII.	1750	175	0,83			1,40			1,69			3 „ n/10 „ „ 27 „
6. VIII.	1800	250	0,39	2,56	0,427	0,66	4,29	0,715	1,64	*1,676*		4 „ n/10 „ „ 26 „
7. VIII.	1750	320	0,58			1,06			1,83			4 „ n/10 „ „ 26 „
8. VIII.	1750	235	0,24			0,57			[illegible]			4 „ n/10 „ „ 26 „
9. VIII.	[illegible]	[illegible]	[illegible]			[illegible]			[illegible]			4 „ n/10 „ „ 26 „

Datum	Körper-gewicht	Harn-menge	N im Harn	in der Periode	...schnitts-wert von N	C im Harn	in der Periode	...wert von C	... vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	...wert von Ammoniak in der Periode	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g	g		g	
10.VIII.	—	—	—			—			—			
11.VIII.	1750	290	0,31			0,78			2,52			
12.VIII.	1750	195	0,27			0,71			2,63			
13.VIII.	1750	262	0,22			0,96			4,36			
14.VIII.	1850	255	0,15	1,42	0,203	0,62	4,39	0,627	4,13	*3,091*	0,1381	
15.VIII.	1850	245	0,24			0,54			2,25			
16.VIII.	1850	225	0,13			0,37			2,85			
17.VIII.	1800	185	0,10			0,41			4,10			

Kaninehen Nr. 4.

Datum	Körper-gewicht	Harn-menge	N im Harn	Gesamt-N in der Periode	Durch-schnitts-wert von N	C im Harn	Gesamt-C in der Periode	Durch-schnitts-wert von C	C:N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnitts-wert von Ammoniak in der Periode	Durchschnitts-wert von Harnstoff in der Periode	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g	g		g	g	
28.VIII.	1920	324	0,65			1,21			1,86				
29.VIII.	1860	235	—			—			—				
30.VIII.	1850	185	0,26			0,42			1,62				
31.VIII.	1900	220	0,40			0,86			2,15				
1. IX.	1850	350	0,39			0,92			2,36				
2. IX.	1830	270	0,38			0,74			1,95				
3. IX.	1870	220	0,37			0,78			2,11				
4. IX.	1900	345	0,39	7,04	0,414	0,95	14,43	0,864	2,44	*2,050*	0,2325	0,2924	
5. IX.	1900	315	0,40			0,72			1,80				
6. IX.	1870	140	0,35			0,58			1,66				
7. IX.	1890	275	0,38			0,90			2,37				
8. IX.	1890	252	0,32			0,67			2,09				
9. IX.	1880	360	0,66			1,06			1,61				
10. IX.	1860	315	0,35			0,84			2,40				
11. IX.	1875	235	0,33			0,71			2,15				
12. IX.	1900	320	0,46			0,83			1,80				
13. IX.	1890	460	0,52			1,49			2,87				
14. IX.	1840	305	0,43			0,75			1,74				

Kaninchen Nr. 4 (Fortsetzung).

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn ccm	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C:N vom Harn g	Gesamt-C / Gesamt-N	Durchschnittswert von Ammoniak in der Periode g	Durchschnittswert von Harnstoff in der Periode g	Bemerkungen
15. IX.	1840	200	0,26			0,43			1,65				3 ccm n/10 Natronlauge auf 30 ccm Wasser per os gegeben
16. IX.	1860	275	0,50			0,97			1,94				3 ccm n/10 Natronlauge auf 30 ccm Wasser per os gegeben
17. IX.	1860	355	0,70	2,98	0,438	0,91	4,49	0,748	1,30	*1,506*	0,2946	0,4307	4 ccm n/10 Natronlauge auf 30 ccm Wasser per os gegeben
18. IX.	1800	250	0,28			0,50			1,79				4 ccm n/10 Natronlauge auf 30 ccm Wasser per os gegeben
19. IX.	1800	480	0,87			1,17			1,34				4 ccm n/10 Natronlauge auf 30 ccm Wasser per os gegeben
20. IX.	1840	205	0,37			0,51			1,38				4 ccm n/10 Natronlauge auf 30 ccm Wasser per os gegeben
21. IX.	1830	255	0,38			0,75			1,97				
22. IX.	1840	310	0,35			0,59			1,69				
23. IX.	1930	345	0,48			1,11			2,31				
24. IX.	1900	450	0,57	3,99	0,499	1,09	7,49	0,936	1,91	*1,877*	0,2096	0,3696	
25. IX.	1920	385	0,38			0,81			2,13				
26. IX.	1900	380	0,53			1,15			2,17				
27. IX.	1930	320	0,63			0,99			1,57				
28. IX.	1900	370	0,67			1,00			1,49				
29. IX.	1930	435	0,61			1,12			1,84				6,3 ccm Kalkwasser*) per os gegeben
30. IX.	1890	370	0,52			0,75			1,44				6,3 „ „ per os gegeben
1. X.	1910	465	0,60	2,70	0,540	1,12	4,82	0,964	1,85	*1,785*	0,2090	0,3504	6,3 „ „ per os gegeben
2. X.	1900	390	0,55			0,99			1,80				8,4 ccm Kalkwasser**) per os gegeben
3. X.	1910	330	0,42			0,84			2,00				8,4 „ „ per os gegeben
4. X.	1860	0	—			—			—				8,4 „ „ per os gegeben
5. X.	1900	300	0,59			0,78			1,32				
6. X.	1860	300	0,63			0,99			1,57				
7. X.	1890	360	0,50			1,04			2,08				
8. X.	1880	365	0,41			0,99			2,41				
9. X.	1880	250	0,39	5,10	0,510	0,80	10,34	1,034	2,05	*2,027*	0,1734	0,2810	
10. X.	1885	330	0,55			1,08			1,96				
11. X.	1930	380	0,43			0,97			2,26				
12. X.	1900	400	0,39			0,82			2,10				
13. X.	1900	415	0,46			1,09			2,37				
14. X.	1880	540	0,75			1,78			2,37				

Kaninchen Nr. 6.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
29. X.	2000	275	0,616			0,846			1,373		
30. X.	1900	300	0,388			0,655			1,688		
31. X.	1870	370	0,725	3,541	0,590	1,384	5,900	0,983	1,909	*1,666*	
1. XI.	1985	295	0,630			0,944			1,498		
2. XI.	1880	270	0,491			0,707			1,440		
3. XI.	1760	310	0,691			1,364			1,974		
4. XI.	1860	600	1,344			1,789			1,331		100 ccm Neuenahrer Sprudel auf 2 mal per os gegeben
5. XI.	1900	580	1,056			1,322			1,252		100 „ „ „ „ 2 „ per os gegeben
6. XI.	1770	230	2,125	6,477	1,080	1,380	6,710	1,118	0,649	*1,036*	10 „ Neuenahrer Sprudel*) „ 1 mal per os gegeben
7. XI.	1820	350	0,931			0,943			1,013		10 „ „ „ „ 1 „ per os gegeben
8. XI.	1830	500	0,560			0,584			1,043		10 „ „ „ „ 1 „ per os gegeben
9. XI.	1850	470	0,461			0,692			1,501		10 „ „ „ „ 1 „ per os gegeben
10. XI.	1750	590	0,743			1,419			1,910		
11. XI.	1700	550	0,924			1,320			1,429		
12. XI.	1630	540	1,058	5,556	0,926	1,691	9,435	1,573	1,598	*1,698*	
13. XI.	1625	380	1,277			1,485			1,163		
14. XI.	1650	510	1,142			2,381			2,085		
15. XI.	1650	490	0,412			1,139			2,765		

*) 10 ccm Neuenahrer Sprudel entsprechen 3,02 ccm n/10 NaOH.

Kaninchen Nr. 7.

Datum	Körpergewicht	Harnmenge	N im Harn	Gesamt-N in der Periode	Durchschnittswert von N	C im Harn	Gesamt-C in der Periode	Durchschnittswert von C	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g			
30. X.	1950	170	0,286			0,417			1,458		
31. X.	1900	190	0,532			0,773			1,453		
1. XI.	1900	205	0,494	3,356	0,559	0,736	4,586	0,764	1,490	*1,349*	
2. XI.	1810	155	0,543			0,629			1,158		
3. XI.	1835	238	0,733			0,875			1,194		
4. XI.	1820	305	0,768			1,156			1,505		
5. XI.	1810	150	0,504			0,691			1,371		60 ccm v. 0,1 proz. Neuenahrer Salzemuls.*) pro os gegeben.
6. XI.	1770	190	0,771	2,602	0,651	0,770	2,983	0,746	0,999	*1,146*	60 „ v. 0,1 „ „ „
7. XI.	1800	340	1,132			1,313			1,160		60 „ v. 0,1 „ „ „
8. XI.	1700	82	0,195			0,209			1,072		60 „ v. 0,1 „ „ „
9. XI.	†										

† Todesursache Pneumonie. — *) 1 g Salz entspricht 160 ccm von n/10 NaOH.

Kaninchen Nr. 8.

Datum	Körpergewicht	Harnmenge	N im Harn	Gesamt-N in der Periode	Durchschnittswert von N	C im Harn	Gesamt-C in der Periode	Durchschnittswert von C	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g			
10. XI.	2100	380	0,638			0,927			1,453		
11. XI.	2100	430	0,602			1,618			2,688		
12. XI.	2020	355	0,497			1,247			2,489		
13. XI.	1975	610	1,281	5,963	0,852	1,813	10,538	1,505	1,415	*1,767*	
14. XI.	2000	790	1,327			2,025			1,526		
15. XI.	2000	680	0,952			1,999			2,100		
16. XI.	1880	280	0,666			0,909			1,365		

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
17. XI.	2030	585	0,860			1,905			2,215		10 ccm Neuenahrer Sprudel per os gegeben.
18. XI.	2100	400	0,728			1,335			1,834		10 " " "
19. XI.	2060	610	1,025	4,852	0,809	1,687	8,660	1,443	1,646	*1,785*	15 " " "
20. XI.	1915	360	0,504			1,047			2,077		15 " " "
21. XI.	2075	315	1,323			1,814			1,371		15 " " "
22. XI.	2085	280	0,412			0,872			2,117	*1,579*	15 " " "
23. XI.	1930	436	0,835			1,058			1,267		50 ccm Neuenahrer Sprudel per os gegeben.
24. XI.	1810	460	0,772			1,179			1,527		50 " " "
25. XI.	1850	450	0,882	7,970	1,328	1,269	10,541	1,757	1,439	*1,323*	50 " " "
26. XI.	1920	580	2,355			2,468			1,048		50 " " "
27. XI.	1840	945	1,852			2,582			1,394		50 " " "
28. XI.	1970	910	1,274			1,985			1,558		50 " " "
29. XI.	—		—			—			—		
30. XI.	†	420	2,470			2,495			1,010		† Todesursache Schluckpneumonie.

Kaninchen Nr. 9.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	Gesamt-N in der Periode g	Durchschnittswert von N g	C im Harn g	Gesamt-C in der Periode g	Durchschnittswert von C g	C : N vom Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
13. XI.	1920	525	1,147			1,973			1,720		
14. XI.	1980	440	0,739			1,536			2,078		
15. XI.	1950	380	1,117	5,482	0,914	1,877	9,414	1,569	1,680	*1,717*	
16. XI.	1900	450	0,819			1,325			1,618		
17. XI.	1930	690	1,159			1,730			1,493		
18. XI.	1930	550	0,501			0,973			1,942		
19. XI.	—	—	—			—			—		
20. XI.	1935	340	0,381			0,744			1,953		10 ccm Neuenahrer Sprudel per os gegeben.
21. XI.	1885	220	0,616			0,864			1,403		15 " " " " "
22. XI.	1950	495	0,967	2,684	0,537	1,104	3,639	0,728	1,142	*1,356*	15 " " " " "
23. XI.	1935	215	0,443			0,626			1,413		15 " " " " "
24. XI.	1900	76	0,277			0,301			1,087		50 " " " " "
25. XI.	†										† Durch Verletzen beim Eingießen.

Kaninchen Nr. 10.

Datum	Körpergewicht	Harnmenge	N in Harn	Gesamt-N in der Periode	Durchschnittswert von N	C im Harn	Gesamt-C in der Periode	Durchschnittswert von C	C : N von Harn	Gesamt-C / Gesamt-N	Bemerkungen
	g	ccm	g	g	g	g	g	g			
1. XII.	1310	420	0,764			1,603			2,098		
2. XII.	1390	540	0,454			1,267			2,791		
3. XII.	1500	620	0,347	2,719	0,453	1,249	7,562	1,260	3,573	*2,781*	
4. XII.	1550	610	0,427			1,365			3,197		
5. XII.	1500	525	0,515			1,707			3,313		
6. XII.	1370	84	0,212			0,371			1,750		
7. XII.	1470	430	0,722			1,173			1,625		
8. XII.	1510	320	0,538			0,820			1,524		
9. XII.	1470	250	0,490	3,427	0,571	0,894	5,865	0,978	1,824	*1,711*	0,1 g Salz aus Neuenahrer Sprudel per os *ohne Wasser* gegeben*)
10. XII.	1450	450	0,830			1,281			1,543		
11. XII.	1430	385	0,431			0,584			1,355		
12. XII.	—	425	0,416			1,113			2,675		
13. XII.	1330	250	1,190			1,240			1,042		Nachwirkung der Salzgabe.
14. XII.	1375	560	1,490			2,077			1,309		
15. XII.	1375	490	0,480	4,405	0,734	1,299	7,882	1,314	2,706	*1,789*	
16. XII.	1370	472	0,396	1,725	0,431	1,251	4,565	1,141	3,159	*2,646*	
17. XII.	1296	290	0,244			0,800			3,279		
18. XII.	1360	480	0,605			1,215			2,008		

*) 1 g Salz entspricht in der Alkalinität 160 ccm n/10 NaOH.

Datum	ccm	g	g	vom Harn	Proz.		g	
27. XI.	1500	12,18	13,64	1,12	0,42	rechts	6,3	
30. XI.	1500	12,18	17,10	1,36	0,38	„	5,7	
2. XII.	1800	14,36	15,47	1,08	0,08	links	1,14	1/2 Flasche Neuenahrer Sprudel gegeben.
3. XII.	1500	16,38	17,93	1,09	0		0	1/2 „ „ „ „
4. XII.	1600	19,04	17,44	0,92	0,08	„	1,28	1/2 „ „ „ „
7. XII.	1600	21,95	19,55	0,89	0,08	„	1,28	1/2 „ „ „ „
8. XII.	1600	20,61	20,60	0,99	0,08	„	1,28	1/2 „ „ „ „
9. XII.	1600	20,16	21,35	1,06	0,06	„	0,96	1/2 „ „ „ „
14. XII.	1550	16,06	15,98	0,99	0,08	rechts	1,24	
17. XII.	1600	19,26	19,57	1,02	0,25	„	4,00	

Phlorrhizinhund.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	N im Harn g	C im Harn g	C : N vom Harn g	Zuckermenge nach *Bertrand* g	Bemerkungen
1. bis 9. XI.	9021	460	4,98	3,35	0,67	0	Vorperiode, täglicher Durchschnittswert im normalen Zustand.
10. bis 14. XI.	9069	574	6,37	11,32	1,78	19,06	Phlorrhizinperiode. Dem Tier wurde tägl. ca. 0,1 g Phlorrhizin injiziert.
15. XI.	9200	390	4,532	6,290	1,387	9,555	
16. XI.	9200	560	8,938	6,054	0,677	1,176	
17. XI.	9270	400	6,272	4,490	0,716	0,808	
18. XI.	9370	240	3,578	2,568	0,718	0,648	Nachperiode.
19. XI.	9450	690	9,080	5,758	0,634	1,208	
20. XI.	9450	440	6,776	4,560	0,673	0,946	
21. XI.	9530	—	—	—	—	—	
22. XI.	9450	260	4,440	2,985	0,672	0,572	
23. XI.	9480	480	7,594	5,147	0,678	1,200	
24. XI.	9700	740	7,625	5,183	0,680	0,051	Mineralwasser 500 ccm (Neuenahrer Sprudel) per os gegeben.
25. XI.	9670	780	5,242	3,429	0,654	0	„ 500 „ „ „ „ „ „
26. XI.	9700	545	7,020	4,534	0,646	0,327	Ohne Mineralwasser.
27. XI.	9770	545	7,096	4,500	0,634	0,818	
28. XI.	9700	575	4,267	2,751	0,645	0	Mineralwasser 500 ccm per os gegeben.
29. XI.	9670	840	6,233	4,169	0,669	0	„ 500 „ „ „ „
30. XI.	9670	1015	8,526	5,570	0,653	0	„ 500 „ „ „ „
1. XII.	9730	340	5,474	3,692	0,674	0,544	Ohne Mineralwasser.
2. XII.	9650	770	7,762	4,998	0,644	0	

Literatur.

1) *Walter*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 7, 148, 1877. — 2) *Chvostek*, Zentralbl. f. innere Med. 14, 329, 1893. — 3) *Leimdörfer*, diese Zeitschr. 59, 451, 1914. — 4) *Räder*, diese Zeitschr. 69, 257, 1915. — 5) *Atkinson* und *Lusk*, Journ. of biol. chem. 36, 421, 1918. — 6) *Waldbott*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 148. — 7) *Warburg*, Ergebn. d. Physiol. 14, 253, 1914. — 8) *Grafe*, Zeitschr. f. phys. Chem. 79, 421, 1922; Die pathologische Physiologie des Gesamtstoff- und Kraftwechsels bei der Ernährung des Menschen, 1923. — 9) *Lehmann*, Verhandl. d. Magdeburger Naturforscher-Versammlung, 1886. — 10) *A. Löwy*, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1903, S. 378. — 11) *Mäder*, Veröffentl. d. Zentralst. f. Balneol. 2, 1913. — 12) *Bing*, diese Zeitschr. 118, 210, 1921. — 13) *Livierato*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 25, 161, 1889. — 14) *Zuntz*, *Mäder*, *Misch* und *Bing*, Zeitschr. f. Balneol. 12 und 18, 1913. — 15) *Staehelin* und *Maase*, Veröffentl. d. Zentralst. f. Balneol. 2. — 16) *Dürr*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 47, 1925. — 17) *Beckmann*, Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 14, S. 417. — 18) *Grafe*, Zentralbl. f. innere Med. 1925. Nr. 17, S. 16. — 19) *Bickel* und *Kauffmann-Cosla*, Virchows Arch. 259, 1926. — 20) *Arnoldi*, Med. Klinik 1925. — 21) *Glax*, Lehrb. d. Balneotherapie. — 22) *Paul Mayer*, Deutsch. Med. Wochenschr. 1922, Nr. 25. — 23) *Arnoldi* und *Rubitschek*, Ebendaselbst 1922, Nr. 8. — 24. *Arnoldi* und *Ettinger*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 42. — 25) *Maase* und *Salecker*, Veröffentl. d. Zentralst. f. Balneol. — 26) *Gomez* diese Zeitschr. 167, 1926. — 27) *Loewi* und *v. Noordens* Handb. d. Path. d. Stoffw., 2. Aufl., 2, 662, 1907. — 28) *Abderhalden*, Med. Klinik 1924.

Über den Bromgehalt des Organismus.

II. Mitteilung:

Der physiologische Bromgehalt der Organe[1]).

Von

H. Bernhardt und **H. Ucko.**

(Aus der I. medizinischen Universitätsklinik der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1926.)

In unserer ersten Arbeit konnten wir zeigen, daß das Brom ein normaler Bestandteil des menschlichen Blutes ist. Dieser Nachweis wurde zunächst qualitativ im Aschenauszug des Blutes mit Hilfe der *Guareschi*schen Reaktion unter ganz bestimmten Bedingungen ausgeführt. An der Hand großer Blutanalysen sowie mittels einer von uns ausgearbeiteten quantitativen Methodik nach dem Prinzip von *Guareschi*, die in klinisch zur Verfügung stehenden Blutmengen vorgenommen werden kann, stellten wir als normalen Bromgehalt 10 bis 1,5 mg-Proz. Brom fest. Betreffs näherer Einzelheiten verweisen wir auf unsere erste Mitteilung.

Wir schlossen seinerzeit aus diesen Befunden, daß das Brom kein für den Organismus bedeutungsloser Bestandteil sein dürfte, und daß der relativ hohe Bromgehalt des normalen Blutes den Ausdruck eines bisher unbekannten, bestimmt regulierten Bromstoffwechsels darstellen könnte.

Um die Verhältnisse dieses etwaigen Bromstoffwechsels näher zu erfassen, beschäftigten wir uns zunächst mit dem Bromgehalt der Organe. Es kam uns darauf an, festzustellen, ob auch die menschlichen und tierischen Organe einen nennenswerten Gehalt an Brom aufweisen, ob dieser Gehalt an Brom innerhalb bestimmter Grenzen ein konstanter ist, und es schien uns wesentlich, weiterhin die Frage zu klären, ob es bestimmte Organe gibt, in denen sich besonders hohe physiologische Brommengen nachweisen ließen. Speziell diese letzte Möglichkeit schien uns für die Klärung eines etwa vorhandenen Bromstoffwechsels

---

[1]) I. Mitteilung siehe *Bernhardt* und *Ucko*, Über den physiologischen Bromgehalt des Blutes. Diese Zeitschr. 155, 174, 1925.

30*

von besonderer Bedeutung zu sein, denn in Analogie zur Stellung der Schilddrüse zum Jodstoffwechsel wäre auch hier die Auffindung eines Organs mit besonders erheblichem Bromgehalt als Zentralorgan zur Bromregulation im Organismus ein wichtiges Ergebnis.

Wir gingen deshalb an die Untersuchung sämtlicher Organe, wobei wir von vornherein die endokrinen Drüsen besonders berücksichtigen zu müssen glaubten. Die bisher in der Literatur aufzufindenden Untersuchungen seien hier noch einmal kurz zusammengestellt. Betreffs der Kritik der von den einzelnen Autoren verwandten verschiedenen Methoden verweisen wir auf den ausführlichen Literaturbericht unserer ersten Mitteilung.

Von älteren Arbeiten über einen Bromgehalt normaler menschlicher und tierischer Organe sind, abgesehen von den mit chemisch falscher Methodik ausgeführten Untersuchungen von *Justus*, die Ergebnisse von *Dario-Baldi* zu erwähnen, der in normalen Schilddrüsen Brom gefunden hat. Mit einem verfeinerten Verfahren gleichen Prinzips konnte *Labat* späterhin von 24 Schilddrüsen achtmal kein Brom nachweisen. Seine anderen positiven Befunde führt der Autor auf therapeutisch zugeführtes, in der Schilddrüse retiniertes Brom zurück. Mit einer ähnlichen Methode untersuchte in neuerer Zeit *Pillat* eine Reihe von Organen auf Brom, nämlich Leber, Niere, Milz, Gehirn und Schilddrüse. Er konnte in den genannten Organen kein Brom finden und hält das Brom infolgedessen für keinen normalen Bestandteil des Organismus.

Ebenso untersuchte mit einem wenig empfindlichen Verfahren *Pribram* den Bromgehalt von Gehirn, Leber, Milz und Schilddrüse, ohne Brom nachweisen zu können.

Aus neuester Zeit liegen ferner die Untersuchungen von *Damiens* an Hundeblut und Organen vor. *Damiens* arbeitete mit einer von verschiedenen französischen Autoren modifizierten Methode, die ebenfalls wie die unserige auf der *Guareschi*schen Reaktion beruht. *Damiens* fand bei seinem Hunde sowohl im Vollblut und Serum als auch in sämtlichen Organen bestimmte Brommengen. Seine Resultate seien in Tabelle I zusammengestellt.

Um Irrtümer zu vermeiden, untersuchten auch wir zunächst die Organe von Hunden, da man bei den menschlichen Leichen nicht immer ganz mit Sicherheit ausschließen konnte, ob vor dem Tode eine Brommedikation stattgefunden hatte. Später gingen wir stets so vor, daß wir gleichzeitig das Blut der betreffenden Individuen untersuchten, und daß wir das Organmaterial von Leichen aus dem Schauhaus benutzten, bei denen therapeutische Bromzufuhr von vornherein weniger in Frage kam[1]). Auf diese Weise gelang es uns, eine Reihe von völlig

[1]) Für die liebenswürdige Überlassung des Materials möchten wir auch an dieser Stelle dem Institut für gerichtliche Medizin, insbesondere Herrn Dr. *Weimann*, unseren besten Dank aussprechen.

Tabelle I.

Tabelle aus der Arbeit von *Damiens* (C. r. des séances de l'Acad. des sc. **171**, 1920).

Nr.	Tier	Organ	mg auf 100 g frischen Organs Br	Cl	Verhältnis Br/Cl
1	Ochse . .	defibrin. Blut	0,52	396	0,00132
2		Lunge	0,42	348	0,00120
3		Nebenniere	0,13	106	0,00122
1	Hund, 28 kg	Lunge	0,40	210	0,0019
2		Luftröhre	0,20	80	0,0025
3		Leber	0,25	110	0,00227
4		Niere	0,40	210	0,0019
5		Milz	0,41	200	0,00205
6		Herz	0,16	160	0,001
7		Muskel	0,10	55	0,00181
8		Kleinhirn	0,20	130	0,00154
9		Augapfel	nicht meßbar	100	—
10		Schilddrüse	nicht meßbar	—	—
11		Nebenniere	nicht meßbar	210	—
12		Hoden	0,53	220	0,0024
13		Gesamtblut	0,42	270	0,00155
14		Blutserum	0,60	390	0,00153
15		Blutkörperchen	0,50	250	0,002
16		Urin	0,05	36	0,0014
17		Galle	0,08	40	0,0020

einwandfreien Fällen zusammenzustellen, die für die vorliegenden Feststellungen nur berücksichtigt wurden.

Zur Methodik sind wesentliche Änderungen nicht zu verzeichnen.

Die von uns in unserer ersten Arbeit genau beschriebene Anordnung kann für die Organuntersuchung unverändert beibehalten werden und liefert auch hier durchaus brauchbare Resultate. Bei größeren Organmengen mit relativ hoher Trockensubstanz verwandten wir zur Schmelze entsprechend mehr Ätzkali; ferner gaben wir der Bestimmungsflüssigkeit nach dem Neutralisieren nicht 0,7 ccm 25proz. H_2SO_4, sondern 1,5 ccm H_2SO_4 hinzu, da wir feststellen konnten, daß bei 0,7 ccm H_2SO_4 der Indikatorzusatz die Flüssigkeit häufig rot färbte. Besondere Sorgfalt ist auf die Austreibung der Kohlensäure durch Zufügen der Schwefelsäure zu legen. Das Austreiben wird erheblich beschleunigt, wenn das Gefäß nach dem Säurezusatz stark geschüttelt wird. Es hat sich im Laufe unserer vielen Analysen gezeigt, daß bei ungenügender Kohlensäureaustreibung die positive Bromreaktion viel schwächer, ja unter Umständen völlig negativ ausfallen kann. Eine Leerbestimmung im Wasser ist täglich zur Indikatorprüfung auszuführen; außerdem empfiehlt es sich, zum besseren Farbenvergleich neben jeder Bestimmung gleichzeitig eine Wasserbestimmung mitlaufen zu lassen.

Es ließ sich zunächst feststellen, daß sowohl die menschlichen wie die tierischen Organe nachweisbare Mengen von Brom enthielten, wie aus folgenden Protokollen zu entnehmen ist:

Tabelle II.

I. Einzeltabellen der Hundeuntersuchungen.

Nr.	Organ	Verarbeitete Menge (Frischgewicht)	Grenzwert zwischen ccm bzw. g Organ	Bromgehalt auf 100 g Organ (Frischgewicht) mg-Proz.
	Hund I, ♂, 14,0 kg, getötet Mitte Juli 1925 wegen Räude.			
1	Blutserum . .	25,0 ccm	6,5— 7,0 ccm	0,71—0,77
2	Blutkuchen . .	20,0 ccm	9,5—10,5 ccm	0,48—0,53
3	Vollblut . . .	25,0 ccm	8,0— 9,0 ccm	0,55—0,63
4	Herz	22,0 g	8,0— 9,0 g	0,55—0,63
5	Leber	18,0 g	über 9,0 g	nicht ermittelt, sicher weniger als 0,55
6	Milz	20,0 g	7,0— 8,0 g	0,63—0,71
7	Niere	19,2 g	6,0— 7,0 g	0,71—0,83
8	Lunge	20,0 g	6,0— 7,0 g	0,71—0,83
9	Pankreas . . .	19,4 g	8,0— 9,0 g	0,55—0,63
10	Magen	21,5 g	6,5— 8,5 g	0,60—0,77
11	Darm	18,8 g	9,0— 9,5 g	0,50—0,55
12	Muskel	20,4 g	über 10,2 g	nicht ermittelt, sicher weniger als 0,49
13	Fettgewebe . .	19,0 g	7,0— 8,0 g	0,63—0,71
14	Knorpel . . .	13,0 g	6,5 g	0,77
15	Aorta	7,5 g	3,0 g	1,66
16	Haut	27,0 g	11,5—13,5 g	0,37—0,43
17	Kleinhirn . . .	18,0 g	8,0— 9,0 g	0,55—0,63
18	Großhirn . . .	20,0 g	9,0—10,0 g	0,50—0,53
19	Epiphyse + Gehirn . . .	1,0 g	1 g noch negativ	
20	Hoden	9,2 g	4,6 g noch negativ	nicht ermittelt, sicher unter 1,1
21	Hypophyse . .	} Analysen nicht einwandfrei		
22	Schilddrüse . .			
23	Nebenniere . .	2,2 g	unter 2,2 g	nicht ermittelt, sicher mehr als 2,27
	Hund II, 4,75 kg, getötet durch Überfahren am 3. August 1925.			
1	Niere	18,0 g	6,0—0,7 g	0,71—0,83
2	Milz	15,0 g	7,5 g	0,67
3	Kleinhirn . . .	19,0 g	5,5 g	0,90
4	Schilddrüse . .	3,5 g	3,5 g	1,45
5	Aorta	6,0 g	2,0—3,0 g	1,67—2,5
6	Nebenniere . .	1,4 g	unter 1,4 g	nicht ermittelt, sicher mehr als 8,57
7	Epiphyse + Gehirn . . .	1,0 g	1,0 g noch negativ	—
8	Leber	18,0 g	8,0—9,0 g	0,55—0,63
	Hund III, 25 kg, getötet am 26. August 1925.			
1	Blutserum . .	25,0 ccm	6,0—6,5 ccm	0,77—0,83
2	Vollblut . . .	25,0 ccm	7,0—8,0 ccm	0,63—0,71
3	Niere	19,0 g	7,5—8,5 g	0,59—0,67
4	Großhirn . . .	19,0 g	4,0—5,0 g	1,0 —1,25
5	Aorta	15,0 g	2,0—3,0 g	1,67—2,5
6	Rippenknorpel	17,0 g	3,0—5,0 g	1,0 —1,67
7	Hoden + Nebenhoden	20,0 g	7,0—8,0 g	0,63—0,71
8	Schilddrüse . .	6,5 g	3,25 g	1,54
9	Hypophyse . .	etwa 0,4 g	stark positiv	nicht zu ermitteln, sicher mehr als 12,5
10	Nebenniere . .	0,5 g	1,0—1,5 g	3,3—5,0

Tabelle III.

II. Übersichtstabelle aller Untersuchungsresultate.

Nr.	Organ	mg auf 100 g frisches Organ		Nr.	Organ	mg auf 100 g frisches Organ	
		Hund	Mensch			Hund	Mensch
1	Blutserum .	0,71—0,83	1,0—1,6	12	Muskel . .	weniger als 0,50	
2	Blutkuchen	0,48—0,53		13	Fettgewebe	0,63—0,71	
3	Vollblut . .	0,55—0,71	0,8—1,4	14	Knorpel . .	0,77	
4	Herz . . .	0,55—0,63		15	Aorta . . .	1,66—2,5	2,0— 2,5
5	Leber . . .	0,40—0,63	0,6—0,75	16	Haut . . .	0,37—0,43	
6	Milz	0,63—0,71	0,9—1,5	17	Kleinhirn .	0,55—0,90	
7	Niere . . .	0,59—0,83		18	Großhirn .	0,53—1,25	
8	Lunge . . .	0,71—0,83		19	Hoden . .	0,63—0,71	
9	Pankreas .	0,55—0,63		20	Hypophyse	mehr als 12,5	15,0—30,0
10	Magen . .	0,60—0,77		21	Schilddrüse	0,84—1,45	0,9— 1,4
11	Darm . . .	0,50—0,55		22	Nebenniere	3,8 —5,0	1,4— 1,8

Die an den menschlichen Organen gewonnenen Werte stammen aus einem Material von zwölf Fällen. Wir haben uns hierbei auf besonders wichtig erscheinende Organe beschränkt, nachdem wir aus den Analysen an Hunden einen Überblick über die Bromverteilung in den Organen gewonnen hatten. Für die Beurteilung unserer in obigen Tabellen angeführten Ergebnisse ist folgendes zu berücksichtigen.

1. Eine gewisse Beeinträchtigung des normalen Bromgehaltes der untersuchten Organe stellt die Tatsache dar, daß im allgemeinen von der Entnahme der frischen Organe bis zum Analysenbeginn eine Abnahme des Wassergehalts nicht zu vermeiden war. Infolgedessen stimmt das Gewicht der verarbeiteten Mengen nicht völlig mit dem Frischgewicht der betreffenden Organteile überein. Kontrolluntersuchungen ergaben, daß der dadurch bedingte Fehler im Höchstfalle bis zu 0,08 mg-Proz. Brom betragen kann. Andererseits muß man ebenfalls bedenken, daß auf das Frischgewicht von Organen bezogene Zahlen untereinander nicht ohne weiteres verglichen werden können, da der normalerweise verschiedene Wassergehalt der Organe dabei nicht berücksichtigt wird.

2. Weiterhin ist zu erwähnen, daß, wie schon in unserer ersten Mitteilung genauer ausgeführt wurde, bei der von uns angewendeten Methode die Fehlergrenze von der Einengungsmöglichkeit des Schwellenwertes abhängig ist. Die dadurch sich ergebenden Differenzen haben wir in obigen Tabellen durch die Angabe der beiden Grenzwerte berücksichtigt Bei der Berechnung des Bromgehalts der Organe, von denen lediglich ein geringes Material zur Verfügung steht (Hypophyse usw.), erweitert sich naturgemäß diese Differenz bei der Berechnung des prozentualen Bromgehalts. Unter Berücksichtigung der hier angegebenen beeinträchtigenden Momente läßt sich ein genügend genauer Überblick über die Verteilung des Broms im normalen Organismus gewinnen, zumal die Resultate aus einem einwandfreien größeren Material hervorgegangen sind.

Die von uns gefundenen Bromzahlen in den Organen der Hunde (Tabelle II) sind im Vergleich zu den von *Damiens* angegebenen Werten sämtlich höher, zeigen aber eine gewisse Parallelität. Wir haben schon

in unserer ersten Mitteilung über die von uns bei der Nachprüfung der *Damiens*schen Methodik gemachte Beobachtung berichtet, daß die von uns gefundenen Bromwerte in Br-Lösungen stets zu niedrig waren. Wir hatten auch nachweisen können, daß diese Erscheinung offenbar durch den Zusatz von konzentrierter Salzsäure bedingt wurde, die das Auftreten der charakteristischen Bromfarbe bei ganz kleinen Br-Mengen verhinderte. Bei Anwendung von verdünntem Chlorwasser an Stelle der Salzsäure erhielten wir normale Bromwerte. Auf diese Weise könnte man die Unterschiede zwischen den von uns gefundenen Zahlen und denen von *Damiens* erklären.

Bei der Durchsicht der gefundenen Bromwerte fällt auf, daß unter allen Organen *die Hypophyse, die Nebenniere und die Aortenwand die höchsten prozentualen Br-Mengen enthalten.* Unter diesen drei Organen scheint die Hypophyse den größten prozentualen Gehalt aufzuweisen. Wie weit diesen Befunden eine Bedeutung zukommt, vermögen wir zunächst nicht zu sagen. Einmal muß man in Betracht ziehen, daß besonders bei Hypophyse und Nebenniere infolge der Kleinheit dieser Organe ein nur geringer absoluter Bromgehalt tatsächlich vorhanden ist. Andererseits ist es fraglich, ob wir es z. B. in der Hypophyse etwa mit einem Organ zu tun haben könnten, das eine besondere Bedeutung für den in Frage kommenden Bromstoffwechsel hat. Es würde dann jede Erklärung dafür fehlen, wie der immerhin hohe Bromgehalt von Nebenniere und Aortenwand zustande käme. Man muß allerdings daran denken, daß zwischen der spezifischen Funktion von Hypophyse und Nebenniere und der arteriellen Gefäßwand bekannte, physiologisch wohl definierte Beziehungen bestehen, nämlich die Ausregulierung des Blutdruckes und des Gefäßtonus. Wir kennen die Wirkung der aus diesen Drüsen hergestellten Extrakte auf die Gefäßwand und wissen andererseits aus der Pathologie der beiden Drüsen, daß Symptome am Gefäßsystem dabei eine besondere Rolle spielen. Es ist ferner aus der Pharmakologie des Broms als wahrscheinlich anzusehen, daß dieses Element gewisse Wirkungen auf den Blutdruck auszuüben imstande ist. Aus allen diesen Tatsachen ließe sich eine Beziehung des Bromgehalts der drei genannten Organe hinsichtlich ihres physiologischen Konnexes herleiten, ohne daß sich dieselbe zunächst beweisen läßt, und ohne daß wir uns über die Art derselben und die damit zusammenhängende Bedeutung des Broms nähere Vorstellungen machen können. Hierüber sind weitere Untersuchungen im Gange.

Es scheint uns jedoch wichtig, bei dieser Gelegenheit ganz kurz ein prinzipielles Bedenken anzuführen, das sich bezüglich der Bedeutung eines besonderen Bromstoffwechsels, etwa im Sinne des Chlor- oder Jodstoffwechsels, überhaupt erheben muß. Aus zahlreichen, zum Teil schon sehr alten Untersuchungen ist die eigenartige Tatsache bekannt,

daß sich bei länger dauernder Bromzufuhr nicht nur der Bromgehalt der Organe, sondern auch derjenige des Blutes in erheblicher Weise ändert, und zwar so, daß Chlor und Brom sich in äquimolekularen Mengen vertreten. Auf die theoretische Erklärung dieser Tatsache soll hier nicht näher eingegangen werden. In jedem Falle gibt diese Erscheinung zu denken. Es ist zwar bei Fütterung mit bestimmten Elementen im allgemeinen immer möglich, den Gehalt der Organe an diesen Elementen in gewissem Ausmaß zu verändern, aber der physiologische Blutspiegel bleibt stets mit größter Konstanz bestehen. Die Tatsache, daß dies beim Brom nicht der Fall ist, stellt die Existenz eines bestimmt regulierten Bromstoffwechsels immerhin in Frage, wenn man dabei auch erwägen muß, daß der Gehalt des Blutes an Chlor plus Brom stets eine erhebliche Konstanz aufweist.

Wegen der Literatur verweisen wir auf unsere erste Mitteilung (diese Zeitschr. **155**, H. 1/2, 1925).

Zur Analyse der frühtreibenden Wirkung des Warmbades. II.

Von

Karl Boresch.

(Aus dem Laboratorium für Pflanzenernährung der landwirtschaftlichen Abteilung der Prager deutschen technischen Hochschule in Tetschen-Liebwerd.)

(Eingegangen am 15. Februar 1926.)

(Mit 9 Abbildungen im Text.)

In der ersten Mitteilung über diesen Gegenstand[1]) wurde gezeigt, daß sich das in der gärtnerischen Frühtreiberei an Flieder, Maiblumen und anderen Pflanzen bewährte Warmbadverfahren in seiner die Ruhe abkürzenden und entwicklungsbeschleunigenden Wirkung auf ruhende Winterknospen verschiedener einheimischer Holzgewächse durch ein temperiertes Vakuum ersetzen läßt. Als die wesentlichen Wirkungskomponenten des Warmbades sind daher die höhere Temperatur und die Sauerstoffarmut des lauwarmen Wassers anzusehen. Unter den durch das Warmbad oder temperierte Vakuum gesetzten Bedingungen der Sauerstoffnot ist das Auftreten unvollständig oxydierter Stoffe zu erwarten, so daß Produkte des anaeroben Stoffwechsels als die chemisch wirksamen Agenzien beim Frühtreiben warm gebadeter Winterknospen in Frage kommen.

Von diesem Gesichtspunkte aus wurden verschiedene, mit der intramolekularen Atmung zusammenhängende Stoffe[2]) und zum Vergleich mit ihnen chemisch verwandte Körper auf ihre frühtreibende Wirkung an ruhenden Knospen einheimischer Holzpflanzen untersucht. Jede der innerhalb der folgenden Versuche mit römischen Ziffern kenntlich gemachten Gruppen eines Versuchs umfaßte, wo nicht anderes bemerkt, vier Zweige eines Holzgewächses. Das hinter der Nummer jedes Versuchs stehende Datum gibt den Versuchsbeginn an. Die Versuche wurden in den Wintermonaten 1924/25 und 1925/26 angestellt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 153, 313, 1924.

[2]) Einzelne dieser Stoffe stellte dem Verf. Herr *C. Neuberg* in entgegenkommender Weise zur Verfügung, wofür ihm auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Frühtreibversuche mit organischen Säuren.

1. Versuch. 25. November 1924. Injektionen der Knospen I. mit Wasser, mit n/10 Lösungen von II. Propionsäure, III. Milchsäure, IV. Brenztraubensäure, V. Oxalsäure und mit n/100 Lösungen von VI. Propionsäure, VII. Milchsäure, VIII. Brenztraubensäure, IX. Oxalsäure.

Aesculus Hippocastanum wies keine deutlichen Unterschiede im Austreiben auf.

Tilia parvifolia. Die wasserinjizierten Knospen I blieben bis zum 4. Januar 1925 in Ruhe. An diesem Tage waren die anderen Zweige im folgenden Entwicklungszustand: II zwei Endknospen entfaltet, drei in Entfaltung (Beginn des Treibens am 27. Dezember). III zwei Endknospen voll entfaltet, eine in Entfaltung, eine treibt (Beginn des Treibens am 24. Dezember). IV zwei Endknospen und eine obere treiben (Beginn des Treibens am 30. Dezember). V zwei Endknospen in Entfaltung, zwei obere Knospen treiben (Beginn des Treibens am 30. Dezember). VI zwei Endknospen und eine obere treiben (Beginn des Treibens am 30. Dezember). VII eine Endknospe voll entfaltet, zwei Endknospen beginnen sich zu entfalten, eine Endknospe und eine obere treiben (Beginn des Treibens am 27. Dezember). VIII eine Endknospe beginnt mit der Entfaltung, eine Endknospe beginnt zu treiben (Beginn des Treibens am 30. Dezember). IX drei Endknospen im ersten Treiben (Beginn des Treibens am 2. Januar).

n/10 Milchsäure verkürzte die Ruhe um 11 Tage, n/10 Propionsäure um 8 Tage, die übrigen, ausgenommen Oxalsäure, um 5 Tage. Die günstige Wirkung der Milchsäure macht sich auch noch in n/100 Lösung bemerkbar, anscheinend auch die von n/100 Brenztraubensäure.

2. Versuch. 26. November 1924. Injektionen der Knospen mit I. Wasser, II. n-Buttersäure 0,25 Proz., III. Isobutylessigsäure, kalt gesättigt, IV. Caprylsäure 0,25 Proz., V. Caprinsäure, kalt gesättigt.

Aesculus Hippocastanum. 21. Dezember Beginn des Treibens in II, III, und V. Am weitenstens ist II. 27. Dezember. Auch in I und IV beginnt das Treiben. 30. Dezember. In I treibt eine obere Knospe, zwei beginnen. In III treibt eine Knospe, drei beginnen zu treiben. Ebenso in IV. In V treiben zwei Knospen, vier beginnen.

n-Buttersäure kürzt die Ruhe um 6 Tage ab und behauptet auch ihren Vorsprung vor den anderen Säuren.

Tilia parvifolia. 21. Dezember. Nur in II treibt eine Endknospe. 24. Dezember beginnt auch in IV eine Knospe zu treiben, am 27. Dezember auch in I, III und V. 2. Januar. In I treibt eine Knospe, in II treiben vier Knospen und eine beginnt zu treiben, in III treiben zwei Knospen und eine beginnt, in IV treiben fünf Knospen und zwei beginnen, in V treiben zwei Knospen und vier beginnen.

n-Buttersäure schafft also auch hier einen kleinen Vorsprung in der Entwicklung.

Weil die im ersten Versuch angewendeten Säuren in vielleicht zu hohen Verdünnungen verabfolgt wurden, wurde die dort als besonders wirksam erkannte Milchsäure und Brenztraubensäure im folgenden Versuch in 0,5 mol. Konzentration injiziert.

3. Versuch. 1. Dezember 1925. I unbehandelt. Knospen in II mit Wasser, in III mit 0,5 mol. Milchsäure (= 4,50 Proz.), in IV mit 0,5 mol. Brenztraubensäure (= 4,40 Proz.) injiziert.

Aesculus Hippocastanum. 26. Dezember. In III und IV beginnt je eine Endknospe zu treiben. 1. Januar. In III und IV treiben je zwei End-

knospen. 7. Januar. In I und II Ruhe, in III ist eine Endknospe entfaltet, die andere desselben Zweiges treibt. In IV steht die eine der beiden Endknospen eines Zweiges in Entfaltung, die andere hat die Knospenbrechung vollzogen. Bis zum Versuchsende (Mitte Februar) verharrten I und II in Ruhe.

Injektionen mit 0,5 mol. Milchsäure und Brenztraubensäure kürzen die Ruhe einzelner Roßkastanienknospen beträchtlich ab.

Tilia grandifolia. 19. Dezember. In IV beginnen die injizierten Knospen zu treiben. 26. Dezember. In III Beginn des Treibens. 5. Januar. In I Ruhe. In II beginnen zwei Endknospen zu treiben. In III sind zwei Endknospen und eine obere Knospe in Entfaltung, eine Endknospe treibt. In IV ist eine Endknospe voll entfaltet, zwei Endknospen und eine obere treiben. Photographiert (siehe Abb. 1).



Abb. 1. 3. Versuch. Tilia grandifolia.
Von links nach rechts: I unbehandelt, II mit Wasser III mit 0,5 n Milchsäure, IV mit 0,5 n Brenztraubensäure injizierte Knospen, nach 36 Tagen.

Im Vergleich zur Wasserinjektion kürzt injizierte 0,5 mol. Milchsäure die Ruhe der Lindenknospen um 10 Tage, 0,5 mol. Brenztraubensäure um 17 Tage ab; letztere wirkt auf die spätere Entwicklung etwas schädlich ein.

Die Injektionsversuche mit verschiedenen organischen Säuren, auf deren eventuelle Bedeutung für die Abkürzung der Knospenruhe in der ersten Mitteilung ein besonderes Augenmerk gelenkt wurde, lassen deutliche Frühtreibeffekte erkennen. Zwar sind Unterschiede in den Wirkungen der verwendeten Säuren vorhanden, doch reichen die wenigen Tastversuche bei der Unkenntnis ihrer chemischen Wirkungen und Umsetzungen im Stoffwechsel der Knospen nicht aus, um ein endgültiges Urteil darüber zu fällen. Auffallen muß die bedeutende Abkürzung der Ruheperiode durch Milchsäure und Brenztraubensäure, die als Lieferantin des Acetaldehyds in Frage kommen könnte, ähnlich wie das in den folgenden Versuchen geprüfte Methylglyoxal.

Frühtreibversuche mit Methylglyoxal.

4. Versuch. 12. November 1925. I unbehandelt. Knospen in II mit Wasser, in III mit 1 proz. Methylglyoxal (= 0,14 mol.), in IV mit 5 proz. Methylglyoxal (= 0,69 mol.) injiziert.

Tilia grandifolia. (Je zwei Zweige.) 2. Dezember. Nur in IV treibt eine Endknospe. 7. Dezember. In III beginnt eine Endknospe zu treiben, in IV ist eine Endknospe entfaltet, eine treibt. 9. Dezember. In III treibt eine Endknospe, in IV ist eine Endknospe voll entfaltet, eine in Entfaltung. 14. Dezember. Photographiert (siehe Abb. 2). In II begann das Austreiben erst am 17. Januar, in I Ruhe.



Abb. 2. 4. Versuch. Tilia grandifolia.
Links mit Wasser, rechts mit 1 proz. Methylglyoxal injizierte Knospen, nach 32 Tagen.

Injektionen mit Methylglyoxal wirkten an Tilia in ganz hervorragendem Maße frühtreibend. Weil die mit Wasser injizierten Lindenknospen erst am 17. Januar zu treiben begannen, beträgt hier die Abkürzung der Ruheperiode $1\frac{1}{2}$ Monate. Ein so günstiges Ergebnis konnte bei keinem der zu Injektionsversuchen herangezogenen Stoffe wahrgenommen werden (vgl. z. B. Dioxyaceton an Tilia im sechsten Versuch).

5. Versuch. 1. Dezember 1925. I unbehandelt. Knospen in II mit Wasser, in III mit 5 proz. Methylglyoxal (= 0,69 mol.) injiziert.

Aesculus Hippocastanum. 26. Dezember. In III beginnen zwei Endknospen zu treiben. 1. Januar. In III steht eine Endknospe in Entfaltung, drei Knospen treiben. 7. Januar. In I und II Ruhe. In III haben die vier Zweige dieser Gruppe folgenden Entwicklungszustand erreicht: 1. Eine Endknospe voll entfaltet, die andere treibt. 2. Die einzige Endknospe in

Entfaltung, die darunter stehende treibt. 3. Die einzige Endknospe in Ent faltung. 4. Eine der beiden Endknospen beginnt zu treiben. 17. Januar. Photographiert (siehe Abb. 3). 15. Februar. I und II noch in Ruhe.



Abb. 3. 5. Versuch. Aesculus Hippocastanum.
Links mit Wasser, rechts mit 5 proz. Methylglyoxal injizierte Knospen, nach 48 Tagen.

Injiziertes Methylglyoxal brachte sechs Knospen an vier Zweigen der Roßkastanie zur raschen Entwicklung und kürzte die Ruhe um mehr als $1\frac{1}{2}$ Monate ab. Es ist wirksamer als andere gleichzeitig injizierte Stoffe (vgl. die Versuche 3, 7).

Frühtreibversuche mit Dioxyaceton und Aceton.

6. Versuch. 6. November 1925. I unbehandelt. Knospen in II mit Wasser, in III mit 0,5 mol. Aceton, in IV mit 0,5 mol. Dioxyaceton injiziert.

Syringa vulgaris. Die injizierten Knospen trieben nicht aus.

Tilia grandifolia. Am 20. Dezember treibt lediglich in IV eine Endknospe aus. Sonst überall Ruhe. 17. Januar. In I und III Ruhe, in II beginnen drei injizierte Knospen zu treiben, in IV ist eine Endknospe entfaltet.

0,5 mol. Dioxyaceton entfaltet eine schwache frühtreibende Wirkung. Verdünntere Lösungen des injizierten Dioxyacetons blieben unwirksam. Mit $\frac{1}{2}$- und $\frac{1}{4}$ mol. Aceton injizierte Knospen trieben nicht aus und auch $\frac{1}{8}$ mol. schwächte das Austreiben gegenüber den mit Wasser injizierten Lindenknospen. Weil hier in sonst gleichen Konzentrationen das Aceton bereits schädliche Wirkungen ausübte und Acetondämpfe in weiter unten mitzuteilenden Versuchen in geeigneten Dosen die Ruhe wesentlich abzukürzen imstande sind, ist das Dioxyaceton von viel schwächerer Wirkung als das Aceton.

7. Versuch. 1. Dezember 1925. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 6. Versuch.

Aesculus Hippocastanum. 26. Dezember. In III und IV beginnt je eine Endknospe zu treiben. 7. Januar. In I und II Ruhe. In III und IV je eine Endknospe in Entfaltung. I und II verblieb auch weiterhin in Ruhe.

Die frühtreibende Wirkung injizierten 0,5 mol. Acetons und Dioxyacetons kommt in gleicher Weise im Austreiben einer einzigen Endknospe (von vier Zweigen) zum Ausdruck. Verdünntere Lösungen dieser Stoffe wurden hier nicht untersucht.

Frühtreibversuche mit Acetaldehyd, Formaldehyd, Äthylalkohol, Äthyläther und Aceton.

Die Stoffe wurden in Form von Lösungen durch Injektion oder Bad oder in Dampfform den Knospen appliziert.

Im letztgenannten Falle gelangten die Zweige in trockene Glaszylinder mit abgeschliffenem Rande von 3 Liter Inhalt; hinein wurde ein Schälchen gestellt, in das ein bestimmtes Gewicht (Volumen) des flüchtigen Stoffes aus einer Pipette rasch gefüllt wurde, worauf die Zylinder sofort mit einer Gummiplatte und darüber mit einer entsprechend beschwerten Glasplatte zugedeckt wurden. Unter diesen Bedingungen waren die Verluste auf ein Minimum eingeschränkt.

a) Injektionen.

8. Versuch. 21. November 1924. Injektionen der Knospen I. mit Wasser, in den folgenden Gruppen mit 1 Vol.-Proz. Lösungen von II. Äthylalkohol, III. Formaldehyd, IV. Acetaldehyd, V. Aceton.

Syringa vulgaris. Die injizierten Stoffe gaben nur einen geringen Vorsprung im Austreiben im Vergleich zur Wasserinjektion.

Tilia parvifolia. 2. Januar. In III beginnt eine Endknospe zu treiben. 7. Januar. In III beginnen drei Endknospen mit der Entfaltung, sonst Ruhe. 12. Januar. In I Ruhe, in II treiben eine Endknospe und eine obere, in III sind drei Endknospen und eine obere entfaltet, eine Endknospe beginnt mit der Entfaltung. In IV treibt eine, in V zwei Endknospen. 21. Januar. Auch in I beginnt eine Endknospe zu treiben.

Formaldehyd gibt den Lindenknospen einen 19tägigen, Acetaldehyd, Aceton und Äthylalkohol einen 9tägigen Vorsprung im Austreiben.

9. Versuch. 23. November 1924. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 8. Versuch.

Aesculus Hippocastanum. 11. Dezember. In V beginnt eine Endknospe zu treiben, dazu kommt am 16. und 18. Dezember je eine weitere. Am 18. Dezember in II und IV erster Beginn des Treibens, am 21. Dezember auch in I und III, zu welcher Zeit die drei Endknospen in V bereits in voller Entfaltung stehen.

Aceton gab den besten Treiberfolg.

Fraxinus excelsior. Erst am 14. Februar 1925 treibt je eine Endknospe in II und V. 18. Februar. In I beginnt eine mittlere Knospe zu treiben, in II und V je eine Endknospe in Entfaltung. 26. Februar. In I treibt eine obere Knospe, eine mittlere in Entfaltung. In II stehen drei Endknospen in Entfaltung. In III und IV keine Entwicklung infolge Schädigung der Knospen, in V eine Endknospe entfaltet.

Die Eschenknospen treiben erst spät aus. Die Alkoholinjektionen wirkten noch am besten, dann folgt Aceton. Die Aldehyde schädigten.

10. Versuch. 24. November 1924. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 8. Versuch.

Ulmus effusa. 18. Dezember. In IV treibt eine injizierte Knospe, am 27. Dezember eine weitere. 2. Januar. In I und III beginnt je eine injizierte Knospe zu treiben, in IV steht eine Knospe in Entfaltung, zwei treiben.

Acetaldehyd allein vermochte die Ruhe einzelner Ulmenknospen wesentlich abzukürzen.

b) Bäder.

11. Versuch. 20. November 1924. Einstündiges Bad der Zweige bei 12° C in I. Wasser, weiter in 1 Vol.-Proz. Lösungen von II. Äthylalkohol, III. Formaldehyd, IV. Acetaldehyd, V. Aceton.

Corylus Avellana. 4. Dezember. In III und V beginnt die Streckung der Kätzchen, in I, II und IV noch Ruhe. 7. Dezember. In III und V die meisten Kätzchen gestreckt oder gelockert. In IV beginnt die Streckung einzelner Kätzchen. I und II in Ruhe. 11. Dezember. In I und II beginnende Streckung der Kätzchen. 14. Dezember. Kätzchen überall gestreckt.

Vorsprung im Austreiben der Haselnußkätzchen: Bei Formaldehyd und Aceton 7 Tage, bei Acetaldehyd 4 Tage, bei Äthylalkohol kein Vorsprung.

Prunus avium. 2. Dezember. In II bis V beginnen einzelne Knospen zu treiben. I in Ruhe. 7. Dezember. In I beginnt das Treiben, in II bis V fortgeschritten. 9. Dezember. In II bis V beginnen einzelne Knospen sich zu entfalten. 18. Dezember. In I noch keine Blüten, in II sind drei, in III sind sechs, in IV sind fünf, in V sind drei Blüten entfaltet.

Alle Bäder wirksam. Form- und Acetaldehyd wirken etwas stärker als Alkohol und Aceton.

12. Versuch. 21. November 1924. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 11. Versuch.

Forsythia suspensa [Blütenknospen[1]]. 7. Dezember. In IV treiben einige Blütenknospen, in V beginnt das Treiben. 11. Dezember. In III eine unterste Blüte entfaltet, in IV treiben fünf Blütenknospen, davon zwei schon entfaltet. In V bleibt das Treiben auf die unteren Knospen beschränkt. 14. Dezember. In I und II ruhen die Blütenknospen, in III und V sind je zwei unterste Blüten erblüht, in IV sind sieben Blüten entfaltet.

Bei Forsythia steht die frühtreibende Wirkung des Acetaldehyds obenan, dann folgen Formaldehyd und Aceton.

Bei Tilia, Robinia, Betula, Acer, Fraxinus brachten die kurzen Bäder keine oder nur sehr geringe Vorsprünge im Austreiben.

c) Dämpfe.

13. Versuch. 21. November 1924. Durch 24 Stunden bei Zimmertemperatur I. in Luft. In Dämpfen von je 1 g folgender Stoffe auf 3 Liter Luftraum: II. Äthylalkohol, III. Äther, IV. Acetaldehyd, V. Aceton.

Corylus Avellana. 27. November. In II beginnen die Kätzchen sich zu lockern. 29. November. In II Lockerung fortgeschritten, in V beginnt sie. In IV Kätzchen geschädigt. 2. Dezember. In II fast vollendete, in V beginnende Streckung der Kätzchen, in I und III Ruhe. 7. Dezember. Auch in I und III beginnen die Kätzchen mit der Lockerung, Kätzchen in II verstäubt.

---

[1]) Die terminalen Blattknospen trieben auch in I schon nach kurzer Zeit aus und wurden daher nicht weiter berücksichtigt.

Am günstigsten schnitt der Äthylalkohol ab (Vorsprung 10 Tage), dann Aceton (Vorsprung 8 Tage). Äther wirkte nicht, Acetaldehyd schädigte.

Syringa vulgaris. 24. November. Beginn des Treibens in II, IV, V. 28. November. Knospen in II sind im Treiben den Knospen in IV und V etwas voraus. 2. Dezember. Knospen in II, IV, V in Entfaltung. In I und III Ruhe. 7. Dezember. In I und III beginnt das Treiben.

Äthylalkohol, Acetaldehyd und Aceton kürzten in annähernd gleicher Weise die Ruhe um 13 Tage ab. Äther wirkte nicht.

Prunus avium. 27. November. In II, IV und V spitzen die Knospen, am 28. November auch in III. Am weitesten sind sie in II. 7. Dezember. In II und V beginnen die Blütenknospen sich zu entfalten, dann folgen in der Entwicklung III und IV. In I noch Ruhe bis auf die unteren Knospen, die eben zu treiben anfangen. 14. Dezember. Die meisten Blüten in II, III, V, in IV wenige, in I wenige und noch nicht voll erblüht.

Äthylalkohol, Äther und Aceton wirken ungefähr gleich gut, kürzen die Ruhe um 10 Tage ab, Acetaldehyd schädigt schon etwas.

Tilia parvifolia. 21. Dezember. In II treibt eine Endknospe, sonst Ruhe. 30. Dezember. In II tritt die Knospe in Entfaltung, in IV treiben drei Knospen. 2. Januar. In IV treiben fünf Knospen, in II nur eine in Entfaltung. 7. Januar. In III treibt eine, in V beginnen zwei obere Knospen zu treiben. 12. Januar. In I beginnt eine Endknospe zu treiben. In II und III steht je eine Endknospe in Entfaltung. In IV beginnen vier Endknospen mit der Entfaltung, eine obere Knospe treibt. In V treiben zwei Endknospen. Die untersten nahe der Schnittfläche inserierten Knospen, die zum Austreiben neigen und teilweise auch austrieben, wurden nicht berücksichtigt.

Acetaldehyd hat bei vier Lindenknospen die Ruhe um 13 Tage verkürzt, Alkohol nur bei einer Knospe, wenn auch noch mehr.

14. Versuch. 22. November 1924. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 13. Versuch.

Aesculus Hippocastanum. 16. Dezember. In IV treibt eine Seitenknospe, in V treiben drei obere Knospen. Sonst Ruhe. 21. Dezember. In I Ruhe, in II und III beginnen je zwei Endknospen zu treiben, in IV stehen vier obere Knospen in Entfaltung, zwei treiben. In V sind drei Endknospen in voller Entfaltung, zwei andere Knospen treiben. Am 24. Dezember beginnt auch in I das Treiben.

Acetaldehyd und Aceton gibt den Roßkastanienknospen einen achttägigen, Alkohol und Äther einen dreitägigen Vorsprung im Austreiben.

Acer Pseudoplatanus. 21. Dezember beginnt in II und V, am 24. Dezember in IV das Treiben der oberen Knospen. Am 7. Januar bieten die Zweige folgendes Bild: In I Ruhe. In II stehen zwei mittlere Knospen in Entfaltung. In III Ruhe. In IV stehen vier obere Knospen in Entfaltung, eine mittlere beginnt sich zu entfalten. In V treiben drei Endknospen. Am 12. Januar begann auch in I und III das Treiben.

Acetaldehyd gab bei den Ahornknospen den besten Treiberfolg, dann folgen Äthylalkohol und Aceton, Äther war wirkungslos.

Robinia Pseudacacia. 5. Dezember. Beginn des Treibens in II, am 7. Dezember in V, am 9. Dezember in III, am 14. Dezember auch in I. Zu dieser Zeit begannen II und V mit der Knospenentfaltung. In IV Knospen geschädigt.

Mit Alkohol und Aceton der beste Treiberfolg, dann folgt Äther. Acetaldehyd schädigte.

15. Versuch. 24. November 1924. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 13. Versuch.

Larix decidua. 18. Dezember. In IV treiben die mittleren Knospen. 21. Dezember. In IV beginnt die Entfaltung. Sonst Ruhe. 30. Dezember. In III und V beginnt das Treiben, in IV sind die Knospen entfaltet, in I und II noch Ruhe. 2. Januar. Auch in I und II beginnt das Treiben.

Acetaldehyd verkürzte die Ruhe der Lärchenknospen um 15 Tage, Äther und Aceton nur um 3 Tage, Alkohol gar nicht.

Alnus glutinosa. 18. Dezember. In IV treibt eine Blattknospe, am 21. Dezember ist sie entfaltet und eine andere treibt. Am 24. Dezember beginnt auch in V eine obere Knospe zu treiben, am 27. Dezember eine zweite. 2. Januar. In IV Entfaltung der Blattknospen. 7. Januar. In V treiben drei Blattknospen, am 12. Januar eine davon in Entfaltung und drei Knospen treiben. In I, II, III Ruhe, die auch bis zum Schluß des Versuchs am 21. Januar anhielt.

Acetaldehyd verkürzte die Ruhe der Erlenknospen um mehr als 3 Wochen, auch Aceton erzielte einen guten Treiberfolg.

Weil in den Versuchen 13 bis 15 die Dosis von 1 g Acetaldehyd auf 3 Liter Luftraum oft schon verzögernd oder gar schädlich gewirkt hat, wurde in den folgenden Versuchen die Konzentration der Acetaldehyddämpfe nach unten abgestuft, um seinen Wirkungsbereich zu erfassen.

16. Versuch. 28. Oktober 1925. Durch 24 Stunden bei Zimmertemperatur I. in Luft, in Dämpfen von II. 1 g Äther, III. 1 g Acetaldehyd, IV. 0,5 g Acetaldehyd, V. 0,25 g Acetaldehyd, VI. 0,125 g Acetaldehyd auf 3 Liter Luftraum.

Corylus Avellana. Die Kätzchen starben in III und IV ab. Bis zum 3. Dezember hatten sie nirgends ausgetrieben. Vermutlich befanden sie sich zu Versuchsbeginn noch in tiefer Ruhe.

Syringa vulgaris. 2. November. Nur in III und IV beginnt das Treiben. 10. November. In I, II, V, VI Ruhe. In III treiben 16 Knospen, davon drei in Entfaltung. In IV treiben fünf Knospen, davon eine in Entfaltung. 28. November beginnt das Treiben auch an den übrigen Zweigen.

Acetaldehyd (1 g und 0,5 g auf 3 Liter Luftraum) kürzt die Ruhe um 26 Tage ab, während Äther (1 g) wirkungslos war.

17. Versuch. 4. November 1925. Sonst die gleichen Versuchsdaten wie im 16. Versuch.

Forsythia suspensa. Am 15. November beginnen die Blütenknospen in V, am 18. November auch in VI zu treiben. III ist geschädigt. 22. November. In IV sind die Blütenknospen geschädigt, während die mittleren Blattknospen sich entfalten. In V drei Blüten entfaltet, in VI drei Blüten aufgeblüht und drei treiben. Selbst am 2. Dezember (Versuchsende) gab es in I und II noch keine Blüte, nur Blattknospen hatten sich entfaltet.

Die Blütenknospen der Forsythia sind gegen Acetaldehyd sehr empfindlich, am günstigsten wirkte die schwächste Konzentration, die zur Anwendung gelangte, 0,125 g in 3 Liter Luft. Die Blattknospen sind resistenter, am besten entfalteten sie sich in IV. 1 g schädigte beide. Auch die Ätherkonzentration dürfte zu hoch gewesen sein.

18. Versuch. 13. November 1925. Sonst dieselben Versuchsdaten wie im 16. Versuch.

Prunus avium. 18. November. Beginn des Treibens in II, IV, V, am 19. November auch in III, am 22. November auch in VI. In I Ruhe. Es waren aufgeblüht an Blüten in:

Datum	I	II	III	IV	V	VI
29. XI.	0	1	0	2	5	0
30. XI.	0	4	3	6	13	2
1. XII.	0	9	2	11	16	5

Am 3. Dezember Beginn des Treibens auch in I. Die Entwicklung der Blattknospen war am weitesten in II und III fortgeschritten (Entfaltung), während sie in den übrigen Gruppen erst begann.

Für Kirschblütenknospen liegt der beste Frühtreiberfolg mit Acetaldehyd bei 0,25 g auf 3 Liter Luftraum. Acetaldehyd ist hier also deutlich wirksamer als der Äther (1 g). Die Blattknospen sind resistenter, selbst in 1 g Acetaldehyd oder Äther scheint noch nicht das Optimum erreicht zu sein. Acetaldehyd und Äther kürzten die Ruhe um 15 Tage ab. Die zu gleicher Zeit warm gebadeten Prunuszweige des 22. Versuchs begannen schon am 15. November zu treiben, das Warmbad kürzte somit die Ruhe der Kirschknospen um 18 Tage gegenüber den unbehandelten Zweigen ab, wirkte also nur wenig besser als der Acetaldehyd. Was die Zahl der entfalteten Blüten anbelangt, zeitigte umgekehrt der Acetaldehyd eine bessere Wirkung als das Warmbad; denn am 30. November waren nur vier, am 1. Dezember elf Blüten an den warm gebadeten Zweigen aufgeblüht, während zu dieser Zeit die mit Acetaldehyddampf (0,25 g) behandelten Kirschenzweige 13 bzw. 16 Blüten trugen. Alles in allem kommt also der Acetaldehyddampf in seiner Wirkung dem Warmbad gleich.

Robinia Pseudacacia. 28. November beginnt das Treiben in II, am 1. Dezember in VI, am 3. Dezember in V, am 7. Dezember in IV, am 16. Dezember auch in I. III trieb überhaupt nicht aus. Am 16. Dezember boten die oberen Knospen folgendes Bild: In I erster Beginn des Treibens, in II beginnen vier obere Knospen mit der Entfaltung. In III Ruhe. In IV treiben vier obere Knospen, in V Ruhe bis auf eine treibende Knospe, in VI stehen vier Knospen in Entfaltung.

Die Robinie ist für die angewendeten Aldehydkonzentrationen viel empfindlicher als Prunus. Die niedrigste Konzentration wirkte ungefähr wie der Äther, dürfte aber trotzdem noch nicht die optimale sein, denn an den gleichzeitig warm gebadeten Robiniazweigen des 22. Versuchs trieben etwas früher und rascher mehr Knospen aus als an den mit Acetaldehyd behandelten Zweigen.

19. Versuch. 29. November 1925. Sonst die gleichen Versuchsdaten wie im 16. Versuch.

Quercus Robur. 11. Dezember. In V beginnen einzelne obere Knospen zu treiben. 16. Dezember. In II beginnen einige Endknospen zu treiben. In V treiben die unter den Endknospen stehenden Knospen, stehen zum

Teil schon vor der Entfaltung. In VI treibt eine mittlere Knospe. Am 22. Dezember wurde I, II, V photographiert (siehe Abb. 4). 26. Dezember.



Abb. 4. 19. Versuch. Quercus Robur.
Links unbehandelt, Mitte nach 24stündigem Verweilen in Ätherdampf (1 g auf 3 Liter), rechts in Acetaldehyddampf (0,25 g auf 3 Liter), nach 23 Tagen.



Abb. 5. 19. Versuch. Fraxinus excelsior.
Links unbehandelt, Mitte nach 24stündigem Aufenthalt in Ätherdampf (1 g auf 3 Liter), rechts in Acetaldehyddampf (0,25 g auf 3 Liter), nach 35 Tagen.

In I Beginn des Treibens. In II sind vier Endknospen in Entfaltung. III und IV in Ruhe, weil geschädigt. In V sind drei obere Knospen in Entfaltung, in VI treibt eine mittlere Knospe.

Acetaldehyd (0,25 g auf 3 Liter Luft) verkürzte die Ruhe der Eichenknospen um 15 Tage, Äther (1 g auf 3 Liter) um 10 Tage. Während an

den ätherbehandelten Zweigen die Endknospen austrieben, entwickelten sich an den mit Acetaldehyd behandelten Zweigen die darunter stehenden.

Fraxinus excelsior. 11. Dezember. In V beginnt eine Endknospe zu treiben. 16. Dezember. In V ist die Endknospe bereits 1,5 cm lang, noch nicht entfaltet. In IV beginnt eine obere Knospe zu treiben. Alle übrigen Knospen verharrten in Ruhe. 3. Januar. Alle Knospen in Ruhe, nur in V hatte sich die ausgetriebene Endknospe voll entfaltet, in IV war die ausgetriebene Knospe eingegangen. I, II, V wurde photographiert (siehe Abb. 5).

Acetaldehyddampf bewirkte, wenn auch nur an zwei Knospen, ein überraschend frühes Austreiben, das um so bemerkenswerter ist, als ein zu gleicher Zeit (29. November) vorgenommenes siebenstündiges Warmbad bei 33° C keinen Erfolg hatte und die Esche überhaupt spät austreibt.

Überblickt man die in diesem Abschnitt mitgeteilten Ergebnisse, so lassen schon die Injektions- und Badeversuche die gute, frühtreibende Wirkung der angewandten Stoffe erkennen; der lediglich in diesen Versuchen zur Anwendung gelangte Formaldehyd ist gleichfalls ein sehr wirksames Frühtreibmittel. Die in Dampfform und in geeigneter Konzentration dargebotenen Stoffe entfalten durchweg sehr ansehnliche Frühtreibeffekte. Daß der Äther in dieser Hinsicht nicht das leistete, was auf Grund sonstiger Erfahrungen erwartet werden konnte, beruht offenbar darauf, daß die allein verwandte Dosis (1 g auf 3 Liter oder 0,0044 mol.) bei 24stündiger Einwirkung meist zu schwach war. Jedenfalls wirkte er in dieser Konzentration nicht so stark frühtreibend wie Aceton (1 g auf 3 Liter Luft oder 0,0057 mol.) oder Äthylalkohol (1 g auf 3 Liter oder 0,0072 mol.), geschweige denn wie Acetaldehyd (1 g auf 3 Liter oder 0,0075 mol.), und daran ist kaum die geringere molare Konzentration des Ätherdampfes schuld, eher seine geringere Wasserlöslichkeit. Unerwartet[1]) gut schnitt der Äthylalkohol ab aus Gründen, die weiter unten mitgeteilt werden (siehe S. 492). Die unterschiedliche Wirksamkeit der genannten Stoffe findet ihren Ausdruck auch in der Häufigkeit, in der sie Schädigungen an den geprüften Knospen anrichteten. Während 1 g Äther-, Aceton- oder Alkoholdampf fast niemals schädigten, wurden einige der zu den Versuchen herangezogenen Holzgewächse durch 1 g Acetaldehyd in 3 Liter Luft sehr schwer geschädigt, so Tilia, Robinia, Forsythia, Kirschblüten, Haselnußkätzchen und andere. Blütenknospen von Prunus und Forsythia sind gegen Acetaldehyd weniger widerstandsfähig als die Blattknospen dieser Pflanzen. Sehr empfindlich sind die Haselnußkätzchen. Diese verschiedene Resistenz wird zum Teil mit der Durchlässigkeit der Knospenhülle für die Acetaldehyddämpfe zusammenhängen. Der Konzentrationsbereich

[1]) *O. Warburg,* Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 479, verglich Äthylalkohol und Acetaldehyd im Hinblick auf die Hemmung der Atmung roter Blutkörperchen und fand, daß Acetaldehyd schon in 123fach so kleiner Konzentration als Alkohol die Oxydationsgröße roter Blutzellen um 30 bis 70 Proz. herabsetzt.

der Acetaldehyddämpfe, an den die frühtreibenden, etwa der Wirksamkeit des Warmbades entsprechenden Wirkungen gebunden sind, liegt demgemäß meist tiefer als bei den übrigen hier angeführten Stoffen und ist außerdem ziemlich eng. So scheint für Eichenknospen die geeignetste Konzentration 0,25 g Acetaldehyd zu sein, während 0,125 g schon schwächer wirkte und 0,5 g bereits schädigte. Auch für Eschenknospen dürfte die optimale Konzentration bei 0,25 g Acetaldehyd liegen, desgleichen für Kirschblüten, während die Blattknospen der Kirsche in 1 g Acetaldehyd noch nicht geschädigt wurden.

Nachweis der Bildung von Acetaldehyd in warm gebadeten Haselnußkätzchen.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde das Vermögen des Acetaldehyds, die Knospenruhe verschiedener Holzgewächse in einem dem Warmbad entsprechenden Ausmaß abzukürzen, beschrieben. Andererseits ist die Bildung von Acetaldehyd in Pflanzen unter anaeroben Bedingungen bekannt.

Mazé[1]) führt das leichte Absterben stärkehaltiger Samen unter Wasser auf ein in ihnen infolge der Sauerstoffnot gebildetes flüchtiges Gift zurück, wofür er aus Alkohol entstehenden Acetaldehyd hält. Derselbe Autor[2]) fand in unreifen Mais- und Erbsensamen Acetaldehyd und wies auch die Bildung von Acetaldehyd aus Alkohol durch den aus den Keimlingen erhaltenen Saft im Vakuum von 100 mm Hg bei Zimmertemperatur nach. *Stoklasa* und *Ernest* beobachteten das Auftreten von Acetaldehyd in Wurzeln bei Luftabschluß[3]). Den hier am meisten interessierenden Fall teilt *Kostytschew*[4]) mit; in weiblichen und männlichen Blüten der Pappel (Populus balsamifera) wird bei Zimmertemperatur im Wasserstoffstrom Alkohol und Acetaldehyd unter Verbrauch des vorhandenen Zuckers gebildet. Den bei der anaeroben Atmung bisweilen entstehenden Acetaldehyd hält er für eine Vorstufe des Alkohols. Daß tatsächlich die Alkoholbildung in Erbsensamen und Puffbohnen bei Sauerstoffausschluß ganz nach Art der alkoholischen Vergärung des Zuckers durch Hefe ihren Weg über die Zwischenstufe des Acetaldehyds nimmt, der sich durch Abfangen anreichern läßt, haben kürzlich *Neuberg* und *Gottschalk*[5]) bewiesen. Weil Alkohol als das gewöhnlichste Stoffwechselprodukt bei der intramolekularen Atmung auftritt, ist zu erwarten, daß auch seine Vorstufe noch öfter als bisher nachzuweisen sein wird. Auch die verschiedenen Vergärungsformen des Zuckers nach *Neuberg*[6]) dürften bei der anaeroben Atmung der höheren Pflanzen auffindbar sein, sei es, daß Zellstoffe als Abfangsmittel für den Acetaldehyd fungieren oder daß die Reaktion des Protoplasmas darüber entscheidet.

---

[1]) *P. Mazé*, Ann. Inst. Pasteur 1900, Nr. 14, S. 350.
[2]) *Derselbe*, C. r. **151**, 1383, 1910.
[3]) *Stoklasa*, und *Ernest* Jahrb. f. wiss. Bot. **46**, 55, 1908.
[4]) *S. Kostytschew*, *E. Hübbenet* und *A. Scheloumoff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 105, 1913; *S. Kostytschew*, Pflanzenatmung, Berlin 1924, S. 76.
[5]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **160**, 256, 1925.
[6]) *C. Neuberg* und Mitarbeiter, ebendaselbst **89**, 365, 1918; **105**, 307, 1920; **110**, 193, 1920; Chem.-Ztg. **44**, 18, 1920.

Bei dieser Sachlage war es nicht unwahrscheinlich, daß auch in den Knospen unter dem Einfluß der durch das Warmbad geschaffenen Sauerstoffnot Acetaldehyd entsteht, der bei seiner hohen Wirksamkeit auf das Austreiben ruhender Knospen als das chemische Agens des Frühtreibens durch das Warmbad in Frage käme.

Die Versuche zum Nachweis der Acetaldehydbildung unter den Bedingungen des Warmbades wurden in der zweiten Novemberhälfte und Anfang Dezember 1925 vorderhand ausschließlich an Haselnußkätzchen, auch an solchen der Bluthasel ausgeführt. Die abgepflückten Haselnußkätzchen gelangten in Portionen zu 50 g Frischgewicht in die Kolben der in der ersten Mitteilung (diese Zeitschr. **158**, 315, 1924) beschriebenen Apparatur, die den beim Warmbad wirksamen Faktorenkomplex aufzulösen gestattete. Hinsichtlich der Vorbehandlung der Kätzchen sind also auch hier dieselben Gruppen wie dort zu unterschieden:

I. Unbehandelt (Kontrolle).
II. Wasserbad von 30° C.
III. Luftbad von 30° C bei gewöhnlichem Luftdruck.
IV. Vakuum von 30° C und 50 mm Hg.
V. Vakuum von 20° C und 50 mm Hg.

Auf die möglichst wirksame Abdichtung des Vakuums wurde besonders geachtet, um die mit der wiederholten Evakuierung sicherlich verbundenen Verluste an Acetaldehyd möglichst einzuschränken. Nach mehrstündiger Versuchsdauer gelangten die Kätzchen — in II auch mit dem Badewasser — in einen mit kaltem Wasser gefüllten Destillationskolben, aus dem etwa vorhandener Acetaldehyd, unter Einleitung von Wasserdampf, durch einen *Liebig*schen Kühler und eine eisgekühlte Kühlschlange in eine in Eis stehende Vorlage destilliert wurde, bis das Destillat 60 ccm betrug. Im Destillat wurde sodann nach *Neuberg* mit Nitroprussidnatrium und Piperidin auf Acetaldehyd geprüft. Quantitative Bestimmungen sollen im nächsten Winter ausgeführt werden. Vorläufig wurde nur auf die Intensität der Blaufärbung geachtet, die in der folgenden Übersicht der Versuchsergebnisse durch die Zahl der Kreuze (+) veranschaulicht wird, während das Ausbleiben dieser Reaktion durch — ausgedrückt ist.

Pflanze	Versuchstag	Gruppennummer	Vorbehandlung der Gruppe	Aldehydreaktion des Destillates
Grüne Hasel	14. XI.	I	Unbehandelt, 7 Stunden bei Zimmertemp.	—
		IV	Im Vakuum 32°, 50 mm Hg durch 7 Stdn.	+++
	27. XI.	I	Unbehandelt, 6 Stunden bei Zimmertemp.	—
		IV	Im Vakuum 30°, 50 mm Hg durch 6 Stdn.	++
		V	„ „ 20°, 50 „ „ „ 6 „	+
	2. XII.	I	Unbehandelt, 8 Stunden bei Zimmertemp.	—
		III	Im Luftbad 30°, 760 mm Hg durch 9½ Stdn.	+
		II	„ Wasserbad 30° durch 11 Stunden . .	++++
Bluthasel	2. XII.	I	Unbehandelt, 8½ Stdn. bei Zimmertemp.	—
		III	Im Luftbad 30°, 760 mm Hg durch 11 Stdn.	+++
		IV	„ Vakuum 30°, 50 „ „ „ 10 „	++++
		V	„ „ 20°, 50 „ „ „ 10½ „	+++
		II	„ Wasserbad 30° durch 11 Stunden . .	++++

Die Versuche zeigen, daß die Haselnußkätzchen unter den Bedingungen des Warmbades (temperiertes Vakuum) und im Warmbad selbst die größten Acetaldehydmengen gebildet haben, bei höherer Temperatur allein[1]) und im Vakuum von 50 mm Hg bei Zimmertemperatur war die gebildete Acetaldehydmenge viel geringer. Die Unterschiede der unter den verschiedenen Bedingungen entstandenen Acetaldehydmengen entsprechen den Frühtreibeffekten, die sich unter diesen Verhältnissen erzielen lassen; im Warmbad, das am stärksten die Ruheperiode abzukürzen vermag, bildet sich auch der meiste Acetaldehyd. Ein langes oder allzu warmes Warmbad schädigt die Knospen, weil der in ihnen gebildete Acetaldehyd eine bereits giftige Konzentration erreicht hat. Haselnußkätzchen sind gegen Acetaldehyddämpfe wenig resistent, ebenso werden sie durch ein zu hoch bemessenes Warmbad leicht geschädigt. Wie aus obiger Tabelle zu ersehen ist, häuft sich der Acetaldehyd in den Kätzchen der Bluthasel vermutlich infolge ihres höheren Zuckergehalts in größerer Menge als in den grünen Kätzchen an, was unter Umständen zu einer Verzögerung im Austreiben der roten Kätzchen gegenüber den grünen führen kann (siehe die erste Mitteilung, l. c., S. 318).

Die Wirkung des Warmbades auf Knospen, die mit Sulfit oder Dimedon injiziert wurden.

Die folgenden Versuche hatten den Zweck, zu erkennen, wie Abfangmittel für den im Warmbad gebildeten Acetaldehyd das Frühtreiben der Knospen beeinflussen. Das zu den Injektionen verwendete Sulfit wurde nach *Neuberg*[2]) aus Natriumsulfit und Calciumchlorid bereitet.

20. Versuch. 29. November 1924.

I. Mit Wasser } injizierte Knospen bei Zimmertemperatur.
II. Mit Sulfit }
III. Mit Wasser } injizierte und dann 10 Stunden bei 35° C warmgebadete Knospen.
IV. Mit Sulfit }

Bei Syringa vulgaris und Aesculus Hippocastanum waren die Unterschiede im Austreiben nicht deutlich.

Tilia parvifolia. 30. Dezember. Nur in IV beginnen einige obere Knospen zu treiben. 2. Januar. In III beginnen zwei injizierte Knospen zu treiben, in IV treiben fünf Knospen. 4. Januar. In IV beginnen zwei Endknospen bereits mit der Entfaltung. 7. Januar. In III treiben zwei Endknospen, in IV stehen zwei Endknospen in Entfaltung, sechs obere Knospen treiben. 12. Januar. In III sind zwei Endknospen in Entfaltung, drei obere treiben, in IV stehen vier Endknospen in Entfaltung, vier obere treiben. I und II verharrten bis zum Versuchsende (29. Januar) in Ruhe.

---

[1]) Es ist möglich, daß an der Acetaldehydbildung der Gruppe III die im Kolben sich anreichernde Kohlensäure mitbeteiligt war.

[2]) *C. Neuberg*, Zeitschr. f. Bot. 11, 180, 1918.

Bei Tilia hat die Injektion der Knospen mit Sulfit die Wirkung des Warmbades deutlich verstärkt, wie zu erwarten war; das aldehydabfangende Sulfit muß zu einer vermehrten Bildung des Acetaldehyds im Warmbad geführt haben und der entstandene Aldehyd-Sulfitkomplex behindert nicht die Wirkung des Acetaldehyds, wie auch *Neuberg*[1]) für die Aktivierung der Gärung durch Acetaldehyd und sein Bisulfitadditionsprodukt festgestellt hat. Demgemäß verstärkte die Sulfitinjektion der Knospen auch die Wirkung des Acetaldehyddampfes, sowohl die frühtreibende als auch die schädigende.

In den folgenden Versuchen (21 und 22) wurden die ganzen Zweige in bei Zimmertemperatur gesättigten und verdünnteren Lösungen des lipoidlöslichen Dimedons gebadet.

21. Versuch. 4. November 1925. Durch 6 Stunden gebadet I. in Wasser, II. in $^1/_{10}$ gesättigter, III. in $\frac{1}{2}$ gesättigter, IV. in gesättigter Dimedonlösung. Badetemperatur überall 33° C. Eine parallele Versuchsreihe wurde 6 Stunden in Wasser und Dimedonlösungen bei Zimmertemperatur (20° C) gehalten.

Corylus Avellana. 9. November. I in Ruhe. In II, III, IV beginnen sich die Kätzchen zu lockern. 10. November. Streckung der Kätzchen, am weitesten in IV vorgeschritten, dann folgt III, dann II. In I noch Ruhe. 11. November. In I erster Beginn des Treibens. In II beginnen sich einige Kätzchen zu strecken, in III sind zahlreiche Kätzchen in Streckung, in IV sind alle Kätzchen gestreckt und stäuben. Die kalt gebadete Reihe verblieb auch weiterhin in Ruhe.

Die in Dimedon warm gebadeten Kätzchen haben gegenüber den in Wasser gleicher Temperatur gebadeten einen kleinen, aber ausgeprägten Vorsprung, der um so deutlicher ist, je konzentrierter die Dimedonlösung war. Bei Zimmertemperatur keine frühtreibende Wirkung des Dimedons.

22. Versuch. 13. November 1925. Durch 6 Stunden gebadet I. in Wasser, II. in kalt gesättigter Dimedonlösung bei 32 bis 33° C, III. in Wasser, IV. in kalt gesättigter Dimedonlösung bei 20° C.

Syringa vulgaris. 18. November. In I und II Beginn des Treibens. 22. November. In I treiben 13 Knospen, in II treiben 20 Knospen. 25. November. In I beginnende Entfaltung, in II Entfaltung weiter fortgeschritten als in I. In III und IV Beginn des Treibens. 3. Dezember. In I und II volle Entfaltung, in III und IV Beginn der Entfaltung.

Das Dimedonwarmbad gibt den Fliederknospen einen kleinen, aber deutlichen Vorsprung im Austreiben, ein kaltes Dimedonbad nicht.

Prunus avium. 15. November. In I und II Beginn des Treibens. 19. November. In I spitzen die meisten Knospen, in II alle. 25. November. II im Treiben etwas weiter als I. In III und IV Beginn des Treibens. 28. November. In I treiben fast alle Blüten- und Blattknospen, aber noch keine Entfaltung. Ebenso in II, wo jedoch die obersten Blattknospen schon entfaltet sind. In III zeigen einige Knospen ein verstärktes Spitzen, in IV ruhen noch fast alle Knospen, deutlich zurück gegen III. 30. November. In I vier Blüten aufgeblüht, die Blattknospen noch nicht entfaltet. In II sind neun Blüten aufgeblüht, die Blattknospen voll entfaltet. In III treiben

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 145, 1918.

zwölf Knospen, davon zwei in Brechung. In IV spitzen erst einige Knospen, deutlich zurück gegen III. 7. Dezember. In III sind einige Blüten erblüht, einige Blattknospen treiben. In IV beginnen nur sehr vereinzelte Knospen zu treiben. In I und II Blüten abgeblüht.

Das Dimedonwarmbad gibt den Kirschenknospen einen kleinen, aber deutlichen Vorsprung im Austreiben, in der Kälte aber hemmt es deutlich die Entwicklung.

Robinia Pseudacacia. 28. November. In I beginnt eine Endknospe zu treiben. In II treiben zehn obere und mittlere Knospen. In III Ruhe, in IV beginnen zwei Endknospen zu treiben. 1. Dezember. In I treiben drei Knospen, in II 13 Knospen, von denen einige sich schon entfalten. In III treibt eine, in IV fünf Knospen. 7. Dezember. In I stehen drei, in II sind acht obere Knospen in Entfaltung. In III treiben vier, in IV sieben Knospen, beide ungefähr gleich weit, aber sehr zurück gegen I und II.

Das Dimedonwarmbad gibt den Robinienknospen einen kleinen, doch sehr deutlichen Vorsprung im Vergleich zum Warmwasserbad, in der Kälte aber keinen prägnanten.

Das Warmbad der Zweige in Dimedonlösungen hat bei Haselnußkätzchen, Knospen des Flieders, der Kirsche und Robinie zu einem früheren Austreiben und einer rascheren Entwicklung im Vergleich zu den in Wasser derselben Temperatur warm gebadeten Knospen geführt. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß die an diesen Objekten beobachtete Entwicklungsbeschleunigung durch das warme Dimedonbad auf einer Anreicherung wirksamen Acetaldehyds in den Knospen beruht. Denn der Acetaldehyd geht mit dem Dimethylhydroresorcin in eine feste Kondensationsbindung ein, so daß eher eine Herabsetzung der frühtreibenden Wirkung des Warmbades zu erwarten gewesen wäre. Nun gehören alle im 21. und 22. Versuch herangezogenen Pflanzen zu den relativ leicht treibbaren; durch ein zu hoch temperiertes oder zu langes Warmbad, mit anderen Worten durch zu hohe Aldehydkonzentrationen werden sie schon leicht geschädigt; so hatte in einem unserer Versuche ein am 28. Oktober 1925 verabreichtes sechsstündiges Warmbad von 35° C Haselnußkätzchen bereits letal geschädigt. Weil auch das Dimedon selbst, wenn es in kaltem Wasser (20° C) gelöst den Knospen dargeboten wird, keine frühtreibende, eher eine verzögernde Wirkung auf das Austreiben der Knospen ausübt, muß die Erklärung für den Vorsprung der in Dimedon warm gebadeten Knospen vor den in Wasser warm gebadeten darin zu suchen sein, daß der Gehalt der Knospen an freiem und daher wirksamem Acetaldehyd durch seine teilweise Bindung an Dimedon eine für die Knospenentwicklung günstige Herabsetzung erfahren hat. Gestützt wird diese Auffassung des ferneren durch das verzögerte Austreiben der Kirschblüten, die in kalter Dimedonlösung gebadet worden sind; denn im Wasserbad von 20° C, das etwa einem Vakuum dieser Temperatur verglichen werden kann, können sicherlich nur sehr geringe Acetaldehydmengen gebildet werden; werden

sie nun noch durch vorhandenes Dimedon gebunden, dann kann die für das frühe Austreiben der Knospen geeignete Aldehydkonzentration leicht unterschritten werden.

Im folgenden wurde der Versuch gemacht, die frühtreibende Wirkung des Warmbades durch Sauerstoffanreicherung des Badewassers (Durchleiten eines Sauerstoffstroms) aufzuheben, was aus naheliegenden Gründen nur teilweise gelang. Geeigneter dürften für solche Versuche abgeschlossene Gefäße sein, in denen sich der Sauerstoffgehalt der über dem Wasser befindlichen Luft und damit die Sauerstoffkonzentration im Wasser beliebig erhöhen läßt.

23. Versuch. 27. November 1924. I. unbehandelt. II. 9 Stunden bei 32° C warm gebadet, III. 9 Stunden bei 32° warm gebadet bei Durchleitung von Sauerstoff (120 Blasen in 1 Minute).

Ulmus campestris. 21. Dezember. In II treibt eine Endknospe. In I und III Ruhe. 4. Januar. In II eine Endknospe entfaltet, eine treibt. In I und III Ruhe. 12. Januar. In II sind zwei Endknospen in Entfaltung. In I und III noch Ruhe.

Tilia parvifolia. 21. Dezember. In II treibt eine Endknospe. 30. Dezember. Auch in I und III beginnen vereinzelte Knospen zu treiben. 4. Januar. In I treiben drei Endknospen. In II sind vier Endknospen bereits in Entfaltung. In III treiben zwei Endknospen und eine obere Knospe. 7. Januar. In I beginnt eine Endknospe mit der Entfaltung, drei Endknospen treiben. In II stehen drei Endknospen in Entfaltung, zwei beginnen mit der Entfaltung, eine treibt. In III beginnen erst drei Endknospen mit der Entfaltung, eine obere Knospe treibt.

An der Ulme und Linde hat die Sauerstoffdurchleitung während des Warmbades den Frühtreibeffekt des lauen Bades etwas herabgesetzt.

Kombination des Warmbades mit einem erhöhten Zuckergehalt der Knospen.

Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, daß der unter den Bedingungen des Warmbades in den Knospen auftretende Acetaldehyd auf Kosten ihres Zuckers entsteht[1]). Der Zuckergehalt der Knospen kann daher für den Erfolg des Warmbades nicht bedeutungslos sein, und weil er sich während des Ruhestadiums ändert, etwa im Oktober sein Minimum aufweist und vom November ab wieder zunimmt, parallel mit dem Ausklingen der Ruhe, könnte die Meinung entstehen, daß die Erfolglosigkeit des Warmbades im Stadium der tiefsten Ruhe der Knospen auf einem Mangel an Zucker als Bildungsstoff des Acetaldehyds beruht. Dann sollten aber Acetaldehyddämpfe jederzeit die Winterruhe aufheben können. Dem ist aber nicht so. Möglich, daß für das

[1]) *Müller-Thurgau* und *Schneider-Orelli*, Flora N. F. 4, 387, 1912, beobachteten Anfang Dezember an 8 Stunden bei 35° gebadeten Fliederknospen schon am ersten Tage eine beträchtliche Abnahme ihres Zuckergehalts, die zum größeren Teile wohl auf Kosten der nach dem Warmbad einsetzenden Atmungssteigerung zu setzen ist. In Maiblumenkeimen trat eine starke Zuckerabnahme auch während des Warmbades selbst ein.

Frühtreiben durch das Warmbad außer diesem Aktivator noch ein entsprechender Zuckergehalt der Knospen notwendig ist; das sollen künftige Versuche klären[1]).

Im folgenden aber soll gezeigt werden, daß künstliche Änderungen des Zuckergehalts ruhender Knospen von namhafter Bedeutung für den Frühtreiberfolg des sich anschließenden Warmbades sind.

24. Versuch. 14. November 1925. Durch 7 Stunden gebadet I. in Wasser, II. in 2proz. Glucoselösung, III. in 4proz. Glucoselösung, alle drei Gruppen bei 31 bis 33° C, IV. in Wasser, V. in 2proz. Glucoselösung, VI. in 4proz. Glucoselösung, diese drei Gruppen bei 20° C. Die Glucoselösungen waren frisch bereitet.

Corylus Avellana. 20. November. In I sind vier Kätzchen, in II sieben, in III zehn Kätzchen gelockert, in II und III stärker als in I. Am 22. November keine deutlichen Unterschiede mehr, fast alle Kätzchen gestreckt. 25. November. In IV Ruhe, in V beginnt an elf, in VI an sieben Kätzchen die Streckung, meist am terminalen Ende. 28. November. In IV Ruhe, in V und VI stehen je 16 Kätzchen in Streckung, in V weiter als in VI. 29. November. In IV ist an drei Kätzchen eine schwache Lockerung zu beobachten, die übrigen Kätzchen bleiben in Ruhe. In V macht die Streckung weiterhin raschere Fortrchritte als in VI. Am 14. Dezember photographiert (siehe Abb. 6).

Das Baden der Haselnußkätzchen in Glucoselösungen kürzt die Ruhe gegenüber einem bloßen Wasserbad ab, deutlich bei niederer Temperatur, eben noch erkennbar bei höherer Temperatur des Bades. Bei niederer Temperatur wirkte 2proz. Glucose etwas besser als 4proz. Ob dabei Acetaldehyd entsteht, wurde noch nicht untersucht, ist aber wahrscheinlich.

25. Versuch. 1. Dezember 1925. I. Unbehandelt. II. Mit Wasser, III. mit 4proz. Glucoselösung injizierte Knospen, die dann durch 8 Stunden im Vakuum bei 33° (50 mm Hg) gehalten wurden.

Tilia grandifolia. 19. Dezember. In III Beginn des Treibens. 26. Dezember. In II beginnen zwei obere Knospen zu treiben. In III treiben vier Endknospen. 3. Januar. I in Ruhe. In II beginnt eine Endknospe mit der Entfaltung eine obere Knospe treibt. In III stehen drei Endknospen in Entfaltung, eine beginnt sich zu entfalten. 7. Januar photographiert (siehe Abb. 7).

Die mit Zuckerlösung injizierten und dann den Bedingungen des Warmbades ausgesetzten Lindenknospen begannen um 7 Tage früher zu treiben als die mit Wasser injizierten und sonst gleich behandelten Knospen und blieben diesen auch in der weiteren Entwicklung voraus.

Acer Pseudoplatanus. 3. Januar. Nur in III beginnt eine Endknospe zu treiben. 11. Januar. In III treiben eine Endknospe und zwei obere

---

[1]) Die Erkenntnis, daß eine gewisse Zuckerkonzentration der Knospen Vorbedingung für das Frühtreiben mit Warmbad ist, beinhaltet selbstverständlich noch keine Stellungnahme zu der schon 1885 von *Müller-Thurgau* [Landw. Jahrb. (*Thiel*) 14, 1885] ausgesprochene Hypothese, die Ruheperiode beruhe auf einem Mangel an reduzierendem Zucker. Gerade die während der Winterruhe vor sich gehenden Änderungen im Zuckergehalt scheinen auf dahinter stehende, heute noch verborgene Vorgänge hinzudeuten.

Knospen, eine obere Knospe beginnt zu treiben. In I und II Ruhe. Das Austreiben in III schreitet bis Mitte Februar (Versuchsende) langsam vor. I und II verharrte in Ruhe.

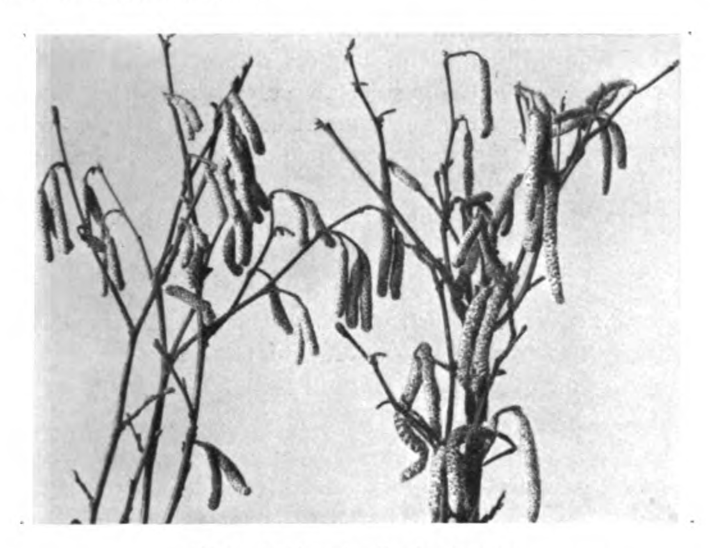


Abb. 6. 24. Versuch. Corylus Avellana.
Links in Wasser, rechts in 2 proz. Glucose bei Zimmertemperatur 7 Stunden gebadet, nach 30 Tagen.



Abb. 7. 25. Versuch. Tilia grandifolia.
Links unbehandelt. Mitte mit Wasser, rechts mit 4 proz. Glucose injizierte und dann einem Vakuum 32°/50 mm Hg ausgesetzte Knospen, nach 34 Tagen.

Die mit 4 proz. Glucose injizierten Ahornknospen konnten unter den Bedingungen des Warmbades zu einem früheren Austreiben (mindestens

1½ Monate früher) veranlaßt werden, nicht dagegen die mit Wasser injizierten.

Die Versuche 24 und 25 zeigen, daß eine offenbar schon geringfügige, durch Bad oder Injektion bewerkstelligte Erhöhung des Zuckergehalts der Knospen ausreicht, um die frühtreibende Wirkung des Warmbades bestimmter Intensität zu verstärken. Bei Anwendung eines höher temperierten oder längeren Warmbades ist zu erwarten, daß durch Einführung von Zucker in die Knospen wohl auch seine schädigende Wirkung verstärkt werden könnte, ebenso wie auch für die Konzentration des dargebotenen Zuckers bei sonst gleicher Intensität des Bades ein Optimum zu bestehen scheint.

Einfluß des vorherigen Aufenthalts der Zweige im Warmhaus auf den Erfolg des Warmbades.

Seit den Untersuchungen *Müller-Thurgaus*[1]) und *Overtons*[2]) über das Stärke-Zuckergleichgewicht in der Pflanze wird allgemein angenommen, daß die Bildung des Zuckers aus Stärke durch niedere Temperaturen gefördert wird, während höhere Temperaturen auf ein Verschwinden des Zuckers hinarbeiten. Auch bei Holzgewächsen dürften ähnliche Verhältnisse obwalten[3]). Im Einklang damit steht der weiter unten mitgeteilte Befund an ruhenden Winterknospen der Eiche. Es besteht daher die in den folgenden Versuchen auch verwirklichte Möglichkeit, den Zuckergehalt der ruhenden Knospen durch Übertragung der Zweige aus der winterlichen Kälte in das Warmhaus (etwa 20° C) herabzusetzen und dan Erfolg des Warmbades an solchen Zweigen mit jenen an dauernd in der Kälte gestandenen zu vergleichen. Insofern also stehen die folgenden Versuche mit den vorangegangenen in innigem Zusammenhang.

Zur Bestimmung des Gehaltes der Eichenknospen an reduzierendem Zucker nach viertägigem Aufenthalt im Warmhaus (W) und in den während dieser Zeit im Freien bei Frost gestandenen Kontrollknospen (K) dienten Knospen, die von 18 bzw. 21 Zweigen mit Hilfe eines Skalpells gleichmäßig abgeschnitten wurden. Das Knospenfrischgewicht jeder Gruppe betrug 2,4 g. Jede Portion wurde in 100 ccm Wasser nach Zusatz von etwas Calciumcarbonat ½ Stunde gekocht, die filtrierten Extrakte wurden nach dem Erkalten auf 100 ccm aufgefüllt und in aliquoten Teilen der nicht gereinigten, wie auch der mit Bleiacetat gefällten Extrakte die Menge reduzierender Stoffe gravimetrisch nach *Pflüger*[4]) bestimmt.

[1]) *Müller-Thurgau*, Landw. Jahrb. **11**, 744, 1882; **14**, 909, 1885.

[2]) *Overton*, Jahrb. f. wiss. Bot. **33**, 171, 1899.

[3]) *B. Niklewski*. Beih. z. Bot. Centralbl. **19**, Abt. 1, S. 90, 1906; *S. Simon*, Jahrb. f. wiss. Bot. **43**, 1, 1906.

[4]) *V. Grafe*, Ernährungsphysiologisches Praktikum höherer Pflanzen, Berlin **1914**, S. 156.

Je 2,4 g frische Eichenknospen lieferten Kupferoxydul in Grammen:

	K	W
Vor der Fällung mit Bleiacetat	0,2590	0,1963
Nach der Fällung mit Bleiacetat und Entbleiung	0,0849	0,0602

Die warmgestellten Eichenknospen enthalten also weniger Zucker als die in der Kälte gestandenen Kontrollen. Am selben Tage (11. Dezember 1925) wurde der zugehörige Treibversuch 26 mit den in gleicher Weise vorbehandelten Eichenzweigen angesetzt.

26. Versuch. 11. Dezember 1925.

I. Unbehandelt, II. Am 11. Dezember warm gebadet,	seit 7. Dezember bei Frost im Freien gestanden.
III. Unbehandelt, IV. Am 11. Dezember warm gebadet,	seit 7. Dezemb. im Warmhaus bei etwa 20° C gestanden.

Das Warmbad der Gruppe II und IV währte 8 Stunden bei 32° C.

Quercus Robur. 29. Dezember. In IV Beginn des Treibens. 1. Januar. In I und II Ruhe. In III beginnt eine Knospe zu treiben, in IV beginnen sechs Knospen zu treiben. 5. Januar. In I Ruhe. In II beginnen zwei Knospen mit der Entfaltung, fünf Knospen treiben. In III beginnen fünf Knospen mit der Entfaltung, sieben Knospen treiben. In IV stehen sieben Knospen in Entfaltung, sechs Knospen treiben. 8. Januar. In I treiben drei Knospen. In II treiben fünf obere und fünf mittlere Knospen, von diesen sind zwei entfaltet. In III sind sechs obere und mittlere Knospen entfaltet oder in Entfaltung, drei treiben. In IV sind sieben obere und drei mittlere entfaltet oder in Entfaltung. Mit zunehmender Entwicklung ergibt sich daher die Reihe: I < II < III < IV.

Die Eiche steht nahe dem Ende ihrer freiwilligen Ruhe. Die 5 Tage früher ins Warmhaus eingestellten Zweige (III) beginnen auch um etwa 5 Tage früher als die im Freien gestandenen Zweige (I) zu treiben. Das Warmbad übte in diesem Versuch auf die vorher ins Warmhaus gestellten Zweige (IV) einen günstigeren Einfluß aus als auf die zuckerreicheren vorher in der Kälte gestandenen Knospen aus; ein auf den ersten Blick unerwartetes Resultat. Es ergibt sich aber hierfür eine leichte Erklärung, wenn man die wahrscheinliche Annahme macht, daß in den kalt gestandenen Knospen infolge ihres höheren Zuckergehalts unter dem Einfluß des Warmbades eine Acetaldehydmenge entstanden ist, die das Austreiben der Knospen bereits etwas verzögert hat. Ein ähnliches Ergebnis zeitigte auch der folgende, dem eben mitgeteilten vorangegangene Versuch, wo die Zweige vor dem Warmbad nur für 24 Stunden in das Warmhaus eingestellt worden waren.

27. Versuch. 18. November 1925.

I. Unbehandelt II. Am 19. November warm gebadet	vorher bei frostfreier Temperatur im Freien gestanden.

III. Nach 24stündigem Aufenthalt im Warmhaus bei etwa 20° C am 19. November warm gebadet.

Das Warmbad von II und III währte 9 Stunden bei 34° C.

Quercus Robur. 1. Dezember. In I und II Ruhe, in III treiben sechs Knospen an den unteren Zweighälften, die am 3. Dezember bereits in

Entfaltung stehen. 7. Dezember. In I und II Ruhe, in III sind 13 Knospen an den unteren Hälften der Zweige in Entfaltung. 9. Dezember. In I und II beginnt je eine Knospe zu treiben, ein deutlicher Unterschied bildete sich hier (zwischen I und II) nicht heraus. Photographiert (siehe Abb. 8).

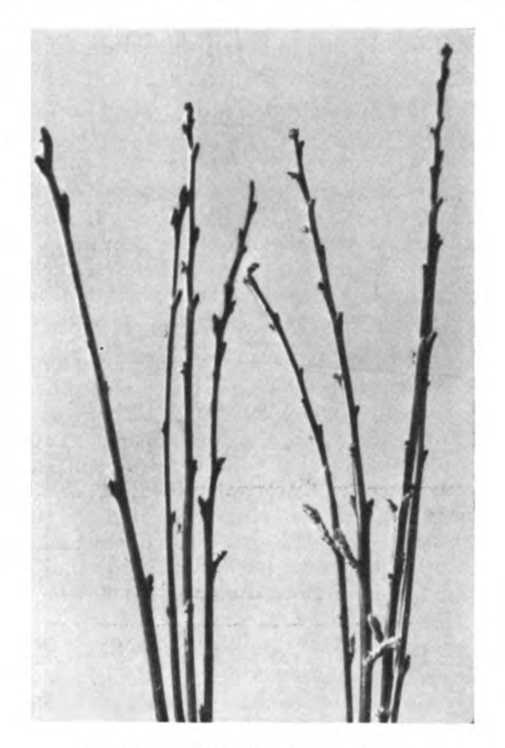


Abb. 8. 27. Versuch. Quercus Robur.
Links vor dem Warmbad im Freien bei tiefer Temperatur, rechts vor dem Warmbad 24 Stunden im Warmhaus, nach 21 Tagen.

Ein 24stündiger Aufenthalt der Eichenzweige im Warmhaus vor dem Warmbad genügte, um die Ruhe der Knospen um 9 Tage zu verkürzen, während das Warmbad von gleicher Temperatur und Dauer an den vorher im Freien gestandenen Zweigen keinen Frühtreibeffekt zu erzielen vermochte. Die Erklärung für diesen so auffälligen Unterschied muß auch hier darin gesucht werden, daß die kalt gestandenen Zweige infolge ihres höheren Zuckergehalts im Warmbad Aldehydmengen gebildet haben, die das frühere Austreiben der Knospen aufheben. Aber auch in den warm gestandenen Zweigen kommt es trotz des geringeren Zuckergehalts der Knospen zu einer partiellen Schädigung; es haben hier nur die Knospen der unteren Zweighälften ausgetrieben; die oberen, nicht ausgetriebenen Knospen waren, weil die Zweige beim Warmbad „per Kopf“ in hohe und schmale Badegefäße getaucht worden sind, in Wassertiefen gelangt, wo infolge des größeren Sauerstoffmangels der Acetaldehyd in schon giftig wirkenden

Mengen gebildet worden sein mag[1]). Wenn aber solche partielle Schädigungen schon an den warm gestandenen Zweigen trotz ihres geringeren Zuckergehalts im Gefolge des Warmbades auftraten, muß dasselbe Warmbad an den vorher der Kälte ausgesetzt gewesenen und daher zuckerreicheren Zweigen eine noch größere Schädigung angerichtet haben, die sich eben darin ausdrückt, daß an diesen Zweigen ein früheres Austreiben nicht eintrat.

Salix spec. 2. Dezember. In II und III Beginn des Treibens. 3. Dezember. In II vier Endknospen in Entfaltung, sechs Knospen treiben. In III sind vier Endknospen und drei obere Knospen in Entfaltung, zwei treiben. 7. Dezember. In II sind vier Endknospen voll entfaltet, eine obere ist in Entfaltung, fünf obere Knospen treiben. In III sind vier Endknospen und zwei obere Knospen voll entfaltet, eine obere in Entfaltung und eine treibt. In I herrscht Ruhe. 14. Dezember. In I beginnt ein Endknospe zu treiben. In II sind vier Endknospen zu stattlichen Zweigen herangewachsen, zwei obere Knospen in Entfaltung, vier treiben, In III sind sechs oberste Knospen zu stattlichen Zweigen herangewachsen, drei Endknospen in Entfaltung und drei treiben.

Auch hier ist ein günstiger Einfluß des vorherigen Aufenthalts im Warmhaus auf den Erfolg des Warmbades zu bemerken, der sich jedoch nicht in einer stärkeren Abkürzung der Ruhe (12 Tage), wohl aber in einer besseren Entwicklung der Knospen kundgibt.

Tilia grandifolia. 16. Dezember. In III beginnen zwei mittlere Knospen zu treiben. 19. Dezember. In II beginnen die drei obersten Knospen eines Zweiges zu treiben. In III ist eine mittlere Knospe entfaltet, eine mittlere treibt. 22. Dezember. In I Ruhe. In II stehen vier obere Knospen in vollem Treiben. In IV ist eine mittlere Knospe entfaltet, eine andere in Entfaltung, so daß die Entwicklung der Knospen am weitesten in III gediehen ist. 1. Januar. I in Ruhe. In II stehen sechs obere Knospen in Entfaltung, eine beginnt zu treiben. In III sind zwei mittlere Knospen in Entfaltung, eine treibt. 5. Januar. In II sind drei Endknospen und drei obere Knospen entfaltet. In III sind drei mittlere Knospen und eine obere entfaltet, keine der Endknospen hat ausgetrieben, so daß nunmehr II in der Knospenentwicklung an der Spitze steht. In I begann das Treiben einzelner Knospen erst am 22. Januar.

Die vor dem Warmbad im Warmhaus gestandenen Lindenknospen zeigen ein ähnliches Verhalten wie die ebenso behandelten Eichenknospen. Sie treiben drei Tage früher aus als die kaltgestandenen, und zwar nur die in der Mitte der Zweige inserierten Knospen, so daß auch hier angenommen werden darf, daß in den Endknospen der per Kopf gebadeten Zweige eine infolge der größeren Sauerstoffnot erhöhte Acetaldehydbildung ihr Austreiben verzögert hat. Die vor dem Warmbad kalt gestandenen Lindenzweige entwickeln aber gerade umgekehrt die Endknospen und überholen schließlich in ihrer Entwicklung die warmgestellten. Womit das zusammenhängt, läßt sich vorderhand nicht sagen. Ist die Eiche ein „Stärkebaum" im Sinne *E. Fischers*[2]), so ist die Linde ein „Fettbaum". Nach allerdings

[1]) Der Unterschied der Wassertemperatur in den Badegefäßen zwischen oben und unten kann nicht die Ursache für das verschiedene Verhalten der Knospen sein, denn er betrug nur 0,3° C.

[2]) *E. Fischer*, Bot. Ztg. 1888, S. 405; Ber. d. deutsch. Bot. Ges. 1886, 4; Jahrb. f. wiss. Bot. 22, 73, 1890.

nur entfernt vergleichbaren Versuchen *Niklewskis* (l. c.) könnte auch in den Lindenknospen der anfängliche Zuckergehalt unter dem Einfluß höherer Temperatur abgenommen haben, ganz so wie in den Eichenknospen im Warmhaus. Hoffentlich werden auch hier Zuckerbestimmungen Klarheit bringen. Jedenfalls ist auch in diesem Versuch zu erkennen, daß außer dem Zuckergehalt der Knospen auch die Wassertiefe, in der die Knospen gebadet werden (Sauerstoffnot), für den Erfolg des Warmbades mitbestimmend ist.

Der nächste Frühtreibversuch betrifft wieder einen „Stärkebaum“, die Ulme. Hier brachte die gewählte Badetemperatur und Badedauer den erwarteten Erfolg. Die Knospen der kalt gestandenen Zweige trieben früher aus als die vorher warmgestellten, offenbar deshalb, weil bei diesem Baume die zufällig gewählte Temperatur und Dauer des Bades der Bildung einer frühtreibend wirkenden und nicht schädigenden Acetaldehydmenge günstig war. Der verringerte Zuckergehalt der warmgestellten Knospen hat hingegen bei der gleichen Intensität des Warmbades für die Bildung optimaler Acetaldehydmengen nicht mehr ganz ausgereicht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von *Portheim* und *Kühn*[1]) beobachteten günstigen Wirkung der Kombination vorgängigen Kühlens und nachfolgenden Warmbades[2]).

28. Versuch. 29. November 1925.

I. Unbehandelt } vorher bei Frost im Freien ge-
II. Am 2. Dezember warm gebadet } standen.
III. Nach dreitägigem Aufenthalt im Warmhaus am 2. Dezember warm gebadet.

Das Warmbad von II und III währte 7 Stunden bei 33° C.

Ulmus effusa. 11. Dezember. In II Beginn des Treibens. 16. Dezember. In III Beginn des Treibens. 19. Dezember. In II sind zwei Endknospen und eine obere Knospe voll entfaltet, fünf treiben. In III sind eine Endknospe und eine obere Knospe in Entfaltung. 21. Dezember. In I Beginn des Treibens. In II sind fünf Knospen entfaltet, drei treiben. In III sind zwei Knospen entfaltet. Photographiert (siehe Abb. 9).

Im folgenden Versuch gelangte noch ein Fettbaum, die Birke, zur Untersuchung.

29. Versuch. 2. Dezember 1925.

I. Unbehandelt } vorher bei Frost im Freien ge-
II. Am 7. Dezember warm gebadet } standen.
III. Nach fünftägigem Aufenthalt im Warmhaus am 7. Dezember warm gebadet.

Das Warmbad von II und III währte 9 Stunden bei 33° C.

---

[1]) *L. v. Portheim* und *O. Kühn*, Österr. bot. Zeitschr. **64**, 410, 1914.

[2]) Auch für das Frühtreiben mit Äther scheint der Zuckergehalt der Knospen von Bedeutung zu sein. Denn *W. L. Howard*, Untersuchungen über die Winterruheperiode der Pflanzen, Diss. Halle 1906; Missouri Sta. Research Bul. 15—17, 21, 1910, 1915, fand eine besonders starke Wirkung des Ätherisierens nach vorausgegangener Einwirkung des Frostes auf die Knospen, doch vertrugen viele Pflanzen diese Behandlungsweise nicht.

Betula verrucosa. 16. Dezember. In I spitzen einzelne Knospen. In II beginnen die Endknospen mit der Entfaltung. In III ebenso, aber etwas zurück gegen II. 21. Dezember. Die meisten Knospen treiben in I und II, in II bereits teilweise Entfaltung. Die wenigsten Knospen treiben in III. 3. Januar. I und II erscheint belaubt, in III treiben nur einige obere Knospen.

Der Birkenversuch zeigt noch deutlicher als die Linde die Schädigung der vor dem Warmbad in die Wärme gestellten Zweige durch das Warmbad, während es an den vorher kalt gestandenen Zweigen fast wirkungslos war.



Abb. 9. 28. Versuch. Ulmus effusa.
Links unbehandelt, Mitte vor dem Warmbad im Freien bei tiefer Temperatur, rechts vor dem Warmbad 3 Tage im Warmhaus, nach 22 Tagen.

Ausblick
auf andere Frühtreibmethoden und die Verhältnisse in der Natur.

Die Ergebnisse aller bisher geschilderten Versuche deuten darauf hin, daß der im Warmbad aus dem Zucker gebildete Acetaldehyd das chemisch wirksame Agens bei diesem praktisch so wichtigen Frühtreibverfahren ist. Je höher der Zuckergehalt der Knospen, je stärker die durch das Warmbad geschaffene Sauerstoffnot der Knospen ist und je länger sie anhält, desto größere Acetaldehydmengen müssen in ihnen gebildet werden, die entweder ein früheres Austreiben oder bei allzu hoher Konzentration des Aldehyds eine Schädigung derselben herbeiführen. Die verschiedenen Pflanzen erweisen sich für Acetaldehyddämpfe ebenso wie für das Warmbad bestimmter Stärke verschieden empfänglich.

Bei der Wesensverwandtschaft der intramolekularen Atmung mit der alkoholischen Gärung wird man sich die Entstehung des Acetaldehyds aus dem in den Knospen enthaltenen Zucker ebenso vorzustellen haben, wie bei der zymatischen Vergärung des Zuckers. Der Acetaldehyd wäre als die Vorstufe des Alkohols anzusehen. Alkohol wurde zwar in den aus warm gebadeten Haselnußkätzchen erhaltenen Destillaten nicht aufgefunden, das könnte aber mit der relativ kurzen Destillationsdauer zusammenhängen. Die Bildung kleiner Alkoholmengen bei Sauerstoffmangel ist ja sehr wahrscheinlich[1]). Unter aeroben Verhältnissen vermögen, wie weiter unten mitgeteilt wird, Haselnußkätzchen ihnen in Dampfform dargebotenen Äthylalkohol teilweise zu Acetaldehyd zu dehydrieren. Während des Warmbades in den Knospen etwa gebildeter Alkohol müßte daher unter den sich anschließenden aeroben Bedingungen dieselbe Umwandlung erfahren. Für die vorübergehende Bildung größerer Aldehydmengen unter anaeroben Bedingungen könnte sehr wohl die Alkalinität des plasmatischen Milieus, in dem sich die intramolekulare Atmung vollzieht, in Frage kommen. Diese Vorstellung wird vielleicht durch den Befund gestützt, daß die Haselnußkätzchen auch unter normalem Luftdruck in schwachen Ammoniakdämpfen Acetaldehyd bilden (siehe unten).

Auf Grund der Erkenntnis, daß die Wirkung des Warmbades auf die Entstehung von Acetaldehyd in den Knospen zurückzuführen ist, reiht sich das Warmbad jener Gruppe von Frühtreibmethoden an, die auf der Anwendung narkotisch wirkender Mittel beruhen, also auch dem Ätherisieren. Doch ist damit für das Verständnis des eigentlichen Wesens der Entwicklungsbeschleunigung der Knospen durch den Acetaldehyd noch nichts gewonnen. *Neuberg*[2]) hat gezeigt, daß der Acetaldehyd wie Aldehyde überhaupt ein mächtiger Aktivator der Gärung und intramolekularen Atmung ist. In der Tat kürzen nach unseren hier nur teilweise mitgeteilten Versuchen auch andere Aldehyde, wie Form-, Glycerin- und Benzaldehyd, die Knospenruhe zum Teil beträchtlich ab. Nach *Neuberg* und *Ehrlich*[3]) kommt die für Aldehyde aufgefundene stimulierende Wirkung den aus ihnen durch Disproportionierung entstandenen Alkoholen und Säuren nicht zu, doch üben auch andere hydrierbare Verbindungen, wie z. B. Ketone, eine wenn auch geringere Stimulationswirkung auf die alkoholische Gärung aus; besonders bei den einfachen Ketonen, wie z. B. dem Aceton, konnte eine solche kaum festgestellt werden. Nach unseren Versuchen aber ist Aceton ein sehr gutes Frühtreibmittel. Andererseits hemmen Aldehyde die Sauerstoffatmung (*Warburg*, l. c.). Man könnte auch daran denken, daß der in

---

[1]) Die Überführung des Acetaldehyds in Alkohol durch verschiedene Pflanzensamen zeigten *Zaleski* und *Marx*, diese Zeitschr. **47**, 184, 1912; **48**, 175, 1912, was schon früher für tierische Gewebe nachgewiesen worden war.

[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 145, 1918.

[3]) *Neuberg* und *Ehrlich*, ebendaselbst **101**, 239 und 276, 1920.

den warm gebadeten Knospen gebildete Acetaldehyd durch Umlagerung oder Oxydation Essigsäure liefert, die zu einer Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration im Plasma führen könnte, wodurch der Anschluß an die in der ersten Mitteilung[1]) ausgesprochene Hypothese über die Bedeutung der organischen Säuren für das Austreiben hergestellt wäre. Der Organismus hätte so in der Einschaltung anaerober Atmung ein einfaches Mittel, den p_H-Wert des Plasmas zu erniedrigen. In dieses noch rätselvolle Gebiet werden künftige Forschungen einzudringen haben, die auf die Untersuchung der Umwandlungen der applizierten Stoffe in der Pflanze und ihrer Auswirkungen auf die Teilprozesse des Lebens zu richten wären. Jedenfalls besteht durchaus die schon 1909 von *Molisch*[2]) hervorgehobene Möglichkeit, „daß die Veränderungen, welche das ruhende Plasma durch Äther oder das Warmbad erfährt, analoge sind".

Die Feststellung, daß in warm gebadeten Haselnußkätzchen der so intensiv frühteibend wirkende Acetaldehyd als anaerobes Stoffwechselprodukt entsteht, gestattet es, eine ganze Reihe anderer Frühtreibmittel dem Warmbad anzureihen, einmal die hier mitgeteilte Frühtreibwirkung injizierten Methylglyoxals und der Brenztraubensäure, die zur Bildung von Acetaldehyd prädestiniert sind. *Zaleski* und *Marx* (l. c.) haben die Verarbeitung der Brenztraubensäure und ihres Natriumsalzes zu Kohlensäure und Acetaldehyd auch im Vakuum durch pflanzliche Samen nachgewiesen. Die so überaus günstige Wirkung des Methylglyoxals auf die Brechung der Knospenruhe könnte gerade damit zusammenhängen, daß es eine langsam, aber länger fließende Quelle für die Acetaldehydbildung vorstellt. Die schon von *Howard*[3]) beobachtete frühtreibende Wirkung eines Vakuums, einer Stickstoff-, Wasserstoff- und Kohlensäureatmosphäre (*Weber*) gehören sicherlich hierher, wahrscheinlich auch das Frühtreiben durch Wasserinjizierung der Knospen (*Weber* und *Jesenko*), die in Kombination mit dem Warmbad nach eigenen Untersuchungen an Aesculus entschieden stärker frühtreibend wirkt als Wasserinjektion oder höhere Temperatur allein. Unter Umständen wird schon bei Zimmertemperatur ein Bad der Zweige, besonders in Zuckerlösungen zur Bildung von Acetaldehydmengen führen, die für das frühere Austreiben empfindlicher Knospen (Haselnußkätzchen) ausreichen. Zuckerinjektionen der Knospen nahm schon *Howard*[4]) mit Erfolg vor. Die frühtreibende Wirkung eines Bades in gärender Zuckerlösung nach *Weber*[5]), die Verfasser auf Grund unabhängig im Jahre 1924 angestellter Versuche bestätigen kann, dürfte nach allem gleichfalls hierher gehören.

---

[1]) *Boresch*, l. c., S. 326 ff.
[2]) *H. Molisch*, Sitzungsber. d. Wien. Akad. 118, 637, 1909.
[3]) *W. L. Howard*, l. c., laut einer freundlichen Zuschrift des Herrn Kollegen Prof. Dr. *F. Weber*, Graz, wofür ihm bestens gedankt sei.
[4]) *Derselbe*, Dissertation Halle 1906.
[5]) *F. Weber*, Die Umschau 28, 40, 1924.

Über das Wesen der Wirkung anderer Frühtreibmittel, deren Verwandtschaft mit dem Warmbad nicht von vorherein zu ersehen ist, wurden erst einige orientierende Versuche an grünen Haselnußkätzchen angestellt, wobei zunächst auf eine eventuelle Entstehung von Acetaldehyd geachtet wurde.

Die Kätzchen gelangten in Portionen zu 50 g Frischgewicht in trockene, luftdicht verschließbare Gläser von 3 Liter Inhalt, in denen sie unter normalem Luftdruck der Einwirkung verschiedener Dämpfe durch 24 Stunden bei Zimmertemperatur ausgesetzt wurden. Die aus den Kätzchen dann gewonnenen Destillate wurden wie früher auf das Vorhandensein von Acetaldehyd geprüft. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Versuchstag 1925	Vorbehandlung der Kätzchen	Aldehydreaktion des Destillates
17. XI.	In Luft	—
	„ Dämpfen von 1 g Äthyläther	—
	„ „ „ 1 „ Aceton	—
	„ „ „ 1 „ Äthylalkohol	+++
24. XI.	In Luft	—
	„ Dämpfen von 2 g Äthyläter	—
	„ „ „ 2 g Aceton	—
	„ „ „ 0,5 g Formaldehyd	—
	„ „ „ Acetylen (aus 1,5 g Carbid)	—
	„ „ „ Ammoniak (2 ccm 25 proz. Lösung)	+
1. XII.	In Luft	—
	„ Dämpfen von Ammoniak (1 ccm 25 proz. Lösung)	+
	„ „ „ „ (0,5 ccm 25 proz. „)	—
	Zerschnittene Kätzchen in Luft	—

Die durch Alkohol- und Ammoniakdämpfe in Haselnußkätzchen hervorgerufene Bildung von Acetaldehyd wurde bereits erwähnt und ist um so bemerkenswerter, als sie sich unter aeroben Verhältnissen vollzieht, sofern man die Ansammlung von Atmungskohlensäure in den abgeschlossenen Gefäßen außer Betracht zieht. Es kann nicht zweifelhaft sein, daß auf der hier beobachteten Acetaldehydbildung die frühtreibende Wirkung des Ammoniaks [*Weber*[1]] und die überraschend starke Frühtreibwirkung des Äthylalkohols beruht.

[1]) *F. Weber*, Sitzungsber. d. Wien. Akad. **125**, **189**, **1916**.

Der in den mit Alkoholdampf vorbehandelten Kätzchen aufgefundene Acetaldehyd stammt sicherlich aus dem in die Kätzchen eingedrungenen Alkohol; denn wäre sein Auftreten einfach die Folge der Narkotisierung (*Verworns* Erstickungshypothese), müßte er füglich auch in den mit Äther oder Aceton behandelten Kätzchen anzutreffen sein. Der Fall der Dehydrierung des Alkohols zu Acetaldehyd durch pflanzliche Gewebe, den *Kostytschew*[1]) für den chemisch wahrscheinlichen Weg seiner Verarbeitung hält, ist hier verwirklicht; gewisse Pflanzen, wie Weizenkörner und Weizenkeime, sind nach ihm gar nicht imstande, Alkohol zu oxydieren. Beim Auftreten von Acetaldehyd in Haselnußkätzchen unter der Einwirkung einer Ammoniakatmosphäre könnte an die Bildung von Acetaldehydammoniak gedacht werden.

Die übrigen untersuchten und als frühtreibend bekannten Mittel ließen unter den Bedingungen dieser Versuche eine Acetaldehydbildung in den Kätzchen nicht erkennen. Es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, ob und wie diese Stoffe in der Pflanze verarbeitet werden. Die Versuche mit starker Dauerbeleuchtung der Kätzchen, die gleichfalls frühtreibend wirkt, haben noch zu keinen eindeutigen Ergebnissen geführt, doch sei an die von *Neuberg*[2]) beschriebene Entstehung von Aldehyden aus Eiweißbausteinen, Kohlenhydraten und Pflanzensäuren bei photokatalytischen Prozessen erinnert. Acetaldehyddämpfe allein ohne künstliche Beleuchtung vermochten in meinen Versuchen die tiefe Ruhe der durch Licht treibbaren Buchenknospen nicht zu brechen.

Nur in aller Kürze seien die Verhältnisse der Winterknospen in der Natur gestreift. Schon in der ersten Mitteilung (l. c., S. 332) wurde auf die Bedeutung der Knospenhülle für das Zustandekommen eines Sauerstoffmangels im Falle einer Atmungssteigerung hingewiesen. Wiederholt wurden auch in verhältnismäßig gut durchlüfteten Pflanzenorganen kleine Alkoholmengen nachgewiesen[3]); um so leichter kommt es hierzu in massigen Organen mit schlechter Durchlüftung. So produzierten nach *Kostytschew*[4]) ungeschälte Erbsensamen im Luftstrom geringe Alkoholmengen, während geschälte Erbsensamen unter den gleichen Bedingungen nicht nur keinen Alkohol gebildet, sondern sogar einen Teil davon verbraucht hatten. Auch das Auftreten kleiner Mengen von Acetaldehyd in schlecht durchlüfteten Pflanzengeweben ist wahrscheinlich nicht selten[5]), so daß auch das Vorkommen von Acetaldehyd in Winterknospen im chemischen Sinne nichts Außergewöhnliches wäre. Wohl aber könnten dem Acetaldehyd bei seinem ausgeprägten Charakter eines im natürlichen Stoffwechsel der Pflanze erzeugten „Reizstoffes“ oder „Giftstoffes“ wichtige physiologische

---

[1]) *S. Kostytschew*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 116, 1910; diese Zeitschr. **15**, 164, 1909.

[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **29**, 279, 1910; **61**, 315, 1914.

[3]) Literatur bei *A. R. Minenkow*, ebendaselbst **66**, 467, 1914.

[4]) *S. Kostytschew*, ebendaselbst 15, 164, 1909.

[5]) Literatur bei *C. Neuberg*, ebendaselbst **160**, 260, 1925.

Funktionen zufallen. Insbesonders wären die Verhältnisse bei Samen ins Auge zu fassen, die in ihrem Verhalten vielfach an Knospen erinnern.

Zusammenfassung.

Die frühtreibende Wirkung des Warmbades (und einiger anderer Frühtreibmittel) auf ruhende Winterknospen verschiedener Holzgewächse wird auf den während des Warmbades in den Knospen aus Zucker entstehenden Acetaldehyd zurückgeführt, dem selbst eine dem Warmbad gleichkommende Frühtreibwirkung eigen ist.

Autorenverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hunderteinundsiebzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Fermente und Licht. IX.
Diastase. IV.

Von

Ludwig Pincussen.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1926.)

Nach der Theorie, welcher die größte Wahrscheinlichkeit zukommt, bestehen die Fermente aus einer spezifischen Komponente und einem kolloidalen Körper mit großer Oberflächenentwicklung. Es scheint nun, daß die Wirkung der Strahlung auf ein Ferment zum wesentlichen Teile davon abhängig ist, wieviel einer kolloiden Substanz in dem Fermentpräparat enthalten ist. Je mehr ein Ferment gereinigt ist, d. h. um so mehr ihm seine Begleitstoffe entzogen werden, desto empfindlicher ist es gegen Licht. Das konnte an Präparaten der Pankreasdiastase (1) gezeigt werden, welche nach dem Verfahren von *Willstätter* einer fortschreitenden Reinigung unterzogen worden waren. Daß die Lichtwirkung sich speziell gegen den einen Teil des Fermentpräparates richtet, während der andere unbeeinflußt bleibt, kann aus Versuchen erschlossen werden, welche in Gemeinschaft mit *Kato* (2) an der Sojaurease angestellt wurden; durch nachträgliches Zufügen des einen Teiles gelang es, die Fermentwirkung belichteter Urease zum Teil wieder herzustellen. Aus alledem scheint sich zu ergeben, daß die Lichtwirkung besonders gegen gewisse kolloide Begleitstoffe bzw. Teilstoffe des Ferments gerichtet ist; sie tritt am intensivsten bei gereinigten Fermenten in die Erscheinung, indem hier das Fermentkolloid wahrscheinlich dem Einfluß der Strahlen in noch höherem Maße freiliegt als bei solchen Lösungen, die durch Begleitstoffe in höherem Grade verunreinigt sind.

In dieser Mitteilung soll über Versuche berichtet werden, in welchen die Reaktivierung eines belichteten Diastasepräparats durch nachträgliche Zugabe des frischen Präparats geprüft wurde.

Die zum Versuch benutzte Diastase war ein Präparat des Handels, Malzdiastase puriss. von *Merck*. Sie enthält also ein verhältnismäßig wenig gereinigtes Ferment und eine Reihe von Beimengungen, die wohl das Ferment in gewissem Sinne gegen Licht schützen, für den in Frage stehenden Versuch jedoch irrevelant sein dürften. Die Versuche sind ausschließlich mit einer 0,1 proz. Lösung dieses Diastasepräparats in Wasser angestellt. Die Bestrahlung der Lösungen erfolgte mit einer Quarzlampe von *Heraeus* mit Amalgamfüllung nach *Arons*, 220 Volt. Die zu belichtenden Lösungen befanden sich in Quarzkölbchen 20 cm von der Lampe entfernt, die unbelichteten Lösungen gegen Strahlung geschützt im gleichen Raume. Als Substrat diente lösliche Stärke in 1 proz. Lösung, der durch Zusatz von m/3 Phosphat das erforderliche p_H erteilt wurde. Die Stärkespaltung wurde an der Maltosebildung gemessen; es wurde ebenso wie in den früheren Arbeiten das Titrationsverfahren von *Willstätter* und *Schudel* benutzt.

Es wurde zunächst geprüft, ob eine Mischung belichteter und unbelichteter Diastase besser wirkt als die Summe der verwandten, für sich geprüften Diastasemengen.

Versuch 1. 15 ccm 1 proz. Lösung löslicher Stärke + 2 ccm m/3 Phosphat, p_H 6,24, + 1 bzw. 2 ccm 0,1 proz. Diastaselösung: 1. unbelichtet, 2. 30 Minuten ohne Puffer in 20 ccm Entfernung mit Quecksilberamalgamlampe bestrahlt.

Nr.	Stärke + Phosphat	Gebildete Maltose mg
1	+ 1 ccm Diastaselösung, unbelichtet	54,0
2	+ 1 „ „ belichtet	45,5
3	+ 2 „ „ unbelichtet	78,5
4	+ 2 „ „ belichtet	59,5
5	+ 2 „ Mischung, belichtet und unbelichtet . .	59,5

20 Minuten Wasserbad bei 40°.

Die Mischung aus 1 ccm unbelichteter und 1 ccm belichteter Diastase wirkt also in gleicher Weise wie 2 ccm belichteter Diastase und schwächer als man es aus der Summe der Wirkung von je 1 ccm belichteter und unbelichteter annehmen sollte.

Hier tritt also die Wirkung des Zusatzes von unbelichteter zu belichteter Diastaselösung nicht deutlich hervor; im Gegenteil ist bei der verhältnismäßig geringen Schädigung eine Besserung durch Zusatz unbelichteter Diastase nicht festzustellen.

Die Verhältnisse werden deutlicher, wenn die Schädigung der Diastase eine größere ist.

Versuch 2. Diastaselösung, 0,1 proz., Belichtung in gleicher Weise 40 Minuten, sonstige Anordnung wie oben.

Nr.	20 ccm Stärkelösung + 2 ccm Phosphat	Gebildete Maltose mg
1	+ 1 ccm Diastase, unbelichtet	51,1
2	+ 1 „ „ belichtet	12,0
3	+ 1 „ Mischung gleicher Teile	38,5

Wasserbad 20 Minuten bei 40°

Die Wirkung der Mischung ist also stärker als die Wirkung der Komponenten, die im arithmetischen Mittel 31,5 mg Maltose betragen würde.

Bei anderen Mischungsverhältnissen ergibt sich das gleiche.

Versuch 3. Diastaselösung, 0,1 proz., 1 Stunde belichtet, sonstige Versuchsbedingungen wie bei Versuch 1, Wasserbad 15 Minuten bei 40°.

Nr.	Stärke + Phosphat	Gebildete Maltose mg
1	+ 1 ccm Diastaselösung, unbelichtet	50,8
2	+ 1 „ „ belichtet	5,25
3	+ 1 „ Mischung, belichtet und unbelichtet	36,8
4	+ 1 „ „ 2 Teile unbelichtet + 1 Teil belichtet	40,5
5	+ 1 „ „ 1 Teil „ + 2 Teile „	29,7

Das eben skizzierte Verhalten zeigt sich hier noch deutlicher, indem die Mischung gleicher Teile belichteter und unbelichteter Diastase um ungefähr 30 Proz. stärker wirkt als die Komponenten allein, die Mischung von 1 Teil unbelichteter und 2 Teilen belichteter Diastase die der Einzelteile sogar um 45 Proz. übertrifft, während eine Mischung aus einer größeren Menge unbelichteter und einer kleineren belichteter nur eine verhältnismäßig geringere Mehrwirkung zeigt. Es ergibt sich also aus diesen Versuchen, daß einmal die „Reaktivierung“ um so intensiver ist, je größer die Lichtschädigung war — sie war bei der geringen Schädigung bei Versuch 1 gar nicht vorhanden — und zweitens, daß die Besserung der Wirkung um so eklatanter wird, je größere Mengen belichteter Diastase in der Mischung vorhanden waren.

Im folgenden Versuch (4) wurde geprüft, ob die nachträgliche Mischung der durch belichtete bzw. unbelichtete Diastaselösungen abgebauten Stärkelösungen zu anderen Ergebnissen führt als die sofortige Mischung der Diastaselösungen und der Zusatz der Mischung zur Stärkelösung. Es wurde darum geprüft: die Wirkung der belichteten und unbelichteten Diastaselösungen und der verschiedenen Mischungen gegenüber dem Zustand, daß die der Menge der Diastase entsprechenden Quantitäten Stärkelösung zunächst, und zwar die halbe Zeit der

Gesamtwirkung durch die einzelnen Komponenten im Wasserbad verdaut und dann zusammengegossen wurden, so daß in der zweiten Hälfte der Zeit die Mischungen wirkten. Es wurde eine 1proz. Stärkelösung unter Zusatz von 10proz. m/3 Phosphat hergestellt und von dieser Mischung 15 ccm für 1 ccm Diastaselösung angewandt. Die Proben 1 bis 4, 6 bis 8, 10 wurden 20 Minuten im Wasserbad bei 40⁰ verdaut, die Proben 5a und b, 9a und b bleiben zuerst 10 Minuten gesondert im Wasserbad, wurden dann schnell zusammengegossen, um weitere 10 Minuten im Wasserbad zu verbleiben.

Versuch 4. Diastaselösung, 0,1proz., Belichtung 40 Minuten durch Quarzamalgamlampe. p_H 6,24.

Nr.	Fermentlösung		Stärkelösung	Gebildete Maltose
	unbelichtet ccm	belichtet ccm	ccm	mg
1	1,0	—	15	56,0
2	0,66	0,33	15	54,0
3	0,66	—	10	35,0
4	—	0,33	5	8,7
5a	0,66	—	10	53,8
5b	—	0,33	5	
6	0,33	0,66	15	46,2
7	0,33	—	5	19,2
8	—	0,66	10	8,7
9a	0,33	—	5	42,8
9b	—	0,66	10	
10	—	1,0	15	15,2

Die Analyse dieses Versuchs ergibt, daß das nachherige Zusammenbringen der anfangs allein verdauten Mischungen zwar eine leichte Minderbildung der Maltose ergibt, was sich ja ohne weiteres aus der schlechten Wirkung der belichteten Diastaselösung in der ersten Hälfte der Zeit ergibt. Immerhin wird diese Minderbildung in der zweiten Hälfte, in welcher auch unbelichtete Diastase zugegen ist, zum größten Teile wieder eingeholt. Des weiteren ergibt sich auch aus diesem Versuch, daß die Reaktivierung belichteter Diastase bedeutend stärker ausgesprochen ist in dem Falle, in welchem die Mengen der belichteten Diastase verhältnismäßig größer waren. Es genügt also von dem angewandten Handelspräparat ein verhältnismäßig geringer Teil, um die Wirksamkeit selbst größerer Mengen durch Licht inaktivierter Diastase wieder beträchtlich zu erhöhen.

Ein in gleicher Weise angestellter Versuch, nur mit dem Unterschied, daß als p_H nicht 6,24, sondern 7 gewählt wurde, verlief in ganz gleicher Weise. In diesem Versuch sind ferner noch die Wirkung von Teilquanten einerseits unbelichteter und andererseits belichteter Diastase bei anfänglicher Einzeldigestion und späterem Zusammenfügen eingereiht.

Versuch 5. Anordnung wie Versuch 4, $p_H = 7$, 0,7 proz. Diastaselösung 40 Minuten belichtet, Wasserbad 24 bzw. zweimal 12 Minuten bei 40°.

Nr.	Fermentlösung		Stärkelösung	Gebildete Maltose
	unbelichtet ccm	belichtet ccm	ccm	mg
1	1,0	—	15	59,6
2	0,66	0,33	15	58,0
3	0,66	—	10	46,4
4	—	0,33	5	7,0
5a	0,66	—	10	56,8
5b	—	0,33	5	
6	0,33	0,66	15	49,8
7	0,33	—	5	11,4
8	—	0,66	10	11,4
9a	0,33	—	5	43,7
9b	—	0,66	10	
10	—	1,00	15	21,0
11a	0,66	—	10	60,5
11b	0,33	—	5	
12a	—	0,66	10	20,2
12b	—	0,33	5	

Auch hier ergibt sich also die leichte Verringerung der später zusammengegossenen Proben gegenüber den sofort mit aktivem und inaktivem Ferment beschickten. Daß diese Verringerung auf die schwächere Wirkung des allein vorhandenen belichteten Ferments zurückzuführen ist, ergibt sich einerseits aus der größeren Differenz bei dem getrennten Versuch, in welchem das belichtete Ferment in größerer Menge angewandt wurde, ferner auch daraus, daß die Einzeldigestion von Teilen unbelichteten Ferments (11) und belichteten Ferments (12) innerhalb der Fehlergrenzen dieselbe Maltosemenge ergibt, als wenn die Digestion sogleich im ganzen vorgenommen wird (1 bzw. 10).

Der Versuch 6 zeigt die Verhältnisse in noch klarerer Weise. Er wurde genau in der gleichen Art wie Versuch 5 angestellt, jedoch mit noch größeren Differenzen belichteter und unbelichteter Diastase.

Es geht aus dieser Tabelle ebenfalls hervor, daß die Aktivierungsfähigkeit unbelichteter Diastase um so intensiver sich zeigt, je größere Mengen belichteter Diastase angewandt wurden und je größer die Lichtschädigung im allgemeinen war. Es genügen also verhältnismäßig kleine Mengen, um die Spaltungsfähigkeit der belichteten Diastase erheblich heraufzusetzen. So wird bei Mischung von 0,1 ccm unbelichteter und 0,9 ccm belichteter Diastase die Maltosebildung auf das Doppelte der durch die Komponenten bewirkten heraufgesetzt. Die übrigen Erscheinungen entsprechen denen, die schon bei den früheren Versuchen hervorgehoben wurden. Es läßt sich vor der Hand nicht sagen, auf welche Begleitstoffe dieses Reaktivierungsvermögen zurück-

Versuch 6. Anordnung wie bei Versuch 4, $p_H = 7$, 0,1 proz. Diastaselösung 70 Minuten belichtet, Wasserbad 24 bzw. zweimal 12 Minuten bei 40°.

Nr.	Fermentlösung unbelichtet	Fermentlösung belichtet	Stärkelösung	Gebildete Maltose
	ccm	ccm	ccm	mg
1	1,0	—	20	57,0
2	0,6	0,4	20	52,5
3	0,6	—	2	47,5
4	—	0,4	8	1,7
5a	0,6	—	12	51,0
5b	—	0,4	8	
6	0,3	0,7	20	40,5
7	0,3	—	6	19,4
8	—	0,7	14	7,0
9a	0,3	—	6	42,0
9b	—	0,7	14	
10	0,1	0,9	21	25,5
11	0,1	—	2	2,6
12	—	0,9	18	9,6
13a	0,1	—	2	23,6
13b	—	0,9	18	
14	—	1,0	20	13,2

zuführen ist; im Gang befindliche Versuche mit gereinigten Fermentpräparaten werden hier wenigstens zum Teil Aufklärung bringen.

Anhangsweise sei noch erwähnt, daß versucht wurde, die hier geschilderte Erscheinung durch Zugabe anderer Kolloide wie kolloidale Metalle, Wittepepton, ferner durch Kohle zu erreichen. Die Versuche führten zu keinem einsinnigen Resultat, so daß zunächst angenommen werden muß, daß auch die zugesetzten Stoffe eine gewisse Spezifität aufweisen müssen.

Literatur.

1) *L. Pincussen*, Fermentforsch. 8, 181, 1925. — 2) *L. Pincussen* und *N. Kato*, diese Zeitschr. 142, 228, 1923.

Analytische Mitteilungen. IV.

Von

Ludwig Pincussen.

Mikrobestimmung von Ionen in Organen und ähnlichem Material.

Von

Georg Cronheim.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1926.)

Während die Mikromethoden für Blut und zum Teil auch für Harn schon eine weitgehende Anwendung gefunden haben, ist bisher die Möglichkeit, Mikrobestimmungen in organischen festen Substanzen wie Tier- und Pflanzengewebe, Fäzes und dergleichen auszuführen, kaum berücksichtigt worden. Es steht außer Zweifel, daß auch für solche Materialien Mikrobestimmungen von höchstem Werte sind, weil bei ihnen die Vorteile zum Teil in noch höherem Maße wie beim Harn zur Geltung kommen. Die Mikromethodik erlaubt uns, mit außerordentlich kleinen Mengen der Organe usw. auszukommen, was besonders beim Arbeiten mit kleinen Tieren von unschätzbarem Vorteil ist. Ferner wird die Arbeitszeit, welche bei Organanalysen besonders lang ist, erheblich abgekürzt.

Die Bestimmung der Ionen selbst entspricht naturgemäß der, welche bei den übrigen Mikromethoden eingeschlagen wird. Daher ist bei der Beschreibung der Bestimmung der Komponenten in der Asche davon abgesehen worden, die einzelnen Reagenzien nochmals genau zu beschreiben, da sie in der Mikromethodik von *Pincussen*[1]) genau aufgeführt sind.

Die Schwierigkeit und das einzige grundsätzlich Neue, über welches in dieser Arbeit berichtet wird, ist die Veraschung. Wir haben zunächst nur die feuchte Veraschung angewandt, weil sie in bezug auf die Apparatur verhältnismäßig einfach ist, auch die Ausführung nur wenig Schwierigkeit darbietet, wenn man dem ausgearbeiteten Verfahren genau folgt. Über trockene Veraschung, die freilich Platinschalen und elektrischen Ofen voraussetzt, soll später berichtet werden.

[1]) 3. Auflage, Leipzig 1925, Georg Thieme.

I. Veraschung.

Eine genau gewogene Menge der Untersuchungssubstanz, die 50 bis 100 mg Mineralbestandteile enthalten soll, wird in einem Mikrokjeldahlkolben mit so viel rauchender Salpetersäure übergossen, daß die Substanz davon vollständig bedeckt ist, und mindestens 1 bis 2 Stunden so belassen: darauf werden 3 ccm 30 proz. Wasserstoffsuperoxyd (Perhydrol *Merck*) zugesetzt. Nachdem die zuerst auftretende starke Gasentwicklung (Kohlenoxyd, Kohlendioxyd, Sauerstoff usw.) aufgehört hat, wird der Kolben auf einem Kjeldahlgestell vorsichtig erhitzt und die Lösung zur Trockne eingedampft; etwaige dabei auftretende Entzündungen schaden nichts. Man läßt abkühlen, gibt dann von neuem 5 ccm Perhydrol und 1 bis 2 ccm Salpetersäure dazu und dampft wieder ein. Dies wird so oft wiederholt, bis der Rückstand fast weiß bzw. die Lösung fast farblos ist. Man läßt abkühlen, verdünnt mit etwa 25 ccm Wasser und dampft auf etwa 5 ccm ein. Ist die Lösung dann noch immer etwas gefärbt, so versetzt man sie mit etwas Perhydrol und kocht nochmals auf. Die Färbung verschwindet dann sicher, falls die Verbrennung vollständig war, farbgebende Ionen, z. B. $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, natürlich ausgeschlossen. Andernfalls muß die Lösung weiter mit Wasserstoffsuperoxyd und Salpetersäure behandelt werden. Sollte in der Lösung eine Trübung vorhanden sein, die auch beim Ansäuern mit Salzsäure nicht verschwindet, so rührt dies von unlöslichen Mineralstoffen her (Kieselsäure, Calciumsulfat usw.), die für sich verarbeitet werden müssen. Man filtriert dann die Lösung in ein Meßkölbchen von 50 ccm und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Mit dieser verdünnten Lösung führt man nun die Einzelbestimmungen aus.

Über die Mengen, die man dazu in den einzelnen Fällen nehmen muß, läßt sich allgemein nichts angeben. Erhält man sehr niedrige Resultate, so sind die Fehlergrenzen naturgemäß höher als bei hohen Resultaten. Andererseits besteht bei sehr hohem Gehalt immer die Möglichkeit, daß die zugesetzten Reagenzien nicht ausreichend und die Ausfällung infolgedessen nicht quantitativ war. In beiden Fällen empfiehlt es sich, die Bestimmung zu wiederholen.

Im einzelnen ist noch folgendes zu beachten: Gibt man das erste Mal Salpetersäure und Wasserstoffsuperoxyd zu, so ist es zweckmäßig, zuerst die Salpetersäure hineinzutun. Man erhält dann eine lebhafte, kurze Gasentwicklung. Macht man es jedoch umgekehrt, so wird die Substanz mit Wasserstoffsuperoxyd durchtränkt und die Salpetersäure kann nur allmählich die Masse angreifen. Da außerdem die Gasentwicklung auf und in der festen Substanz stattfindet, entstehen Aufschwemmungen und kolloidale Lösungen. Dies alles bewirkt, daß man eine sehr träge, schaumige Masse erhält, mit der es sich außerordentlich schlecht arbeiten läßt. Auf alle Fälle muß man so lange warten, bis die Gasentwicklung beendet ist, und auch dann noch zuerst sehr vorsichtig erwärmen, weil es sonst leicht vorkommen kann, daß die Flüssigkeit aus dem Glase herausschäumt. Anders ist es, wenn man die Flüssigkeit schon einmal abgedampft hat. Es ist dann besser, zuerst Wasserstoffsuperoxyd und danach Salpetersäure zuzugeben. In diesem Falle durchsetzt nämlich der nascierende Sauerstoff die ganze Flüssigkeit viel stärker als in dem anderen, wo die Gasentwicklung zum größten Teil an der Oberfläche stattfindet, und die Oxydation geht deshalb viel schneller vor sich.

II. Bestimmung der einzelnen Bestandteile.

a) *Natrium.*

Natrium wird mit dem *Bell*schen Reagens (Kalium-Caesium-Wismut-Nitrit) als Komplexsalz der Formel $9\,CsNO_2 . 6\,NaNO_2 . 5\,Bi(NO_2)_3$ ausgefällt und das Wismut kolorimetrisch als Wismutsulfid bestimmt. Man nimmt eine bestimmte Menge der Lösung, die höchstens 1½ mg Natrium enthalten darf, und dampft in einem großen Jenaer Zentrifugenglas auf etwa 1 ccm ein. Zu der abgekühlten Lösung gibt man etwa 6 ccm *Bell*sches Reagens (für 1 mg Natrium braucht man etwa 3 ccm), verdrängt die noch im Glase vorhandene Luft durch Einfüllen von Leuchtgas, das man durch eine vorgeschaltete, mit Wasser gefüllte Waschflasche von Schwefelwasserstoff befreit hat, und verschließt schnell mit einem Gummistopfen. Sodann stellt man das Glas in einen Eisschrank, wo es bei einer Temperatur von 0 bis 2° mindestens 24 Stunden stehen muß. Ist ein Eisschrank nicht vorhanden oder sind die Natriummengen sehr gering, so lasse man das Glas wenigstens 2 Tage stehen. Die Füllung mit Leuchtgas ist notwendig, um eine Oxydation des Nitrits durch den in der Luft vorhandenen Sauerstoff zu verhindern. Sollte sich infolge Hydrolyse bei der Zugabe des Reagens ein weißer Niederschlag von basischem Wismutsalz bilden, so gebe man noch weiter so lange Reagens dazu, bis sich der Niederschlag wieder gelöst hat.

Der gebildete Niederschlag des Natriumkomplexsalzes wird abzentrifugiert und mehrmals ausgewaschen. Als Waschflüssigkeit dient zuerst zweimal eine eisgekühlte, mit dem *Bell*schen Reagens gesättigte 50proz. Acetonlösung, sodann zweimal eisgekühltes reines Aceton und zum Schluß einmal reines Wasser. Der auf diese Weise gereinigte Niederschlag wird in 10 ccm 2 n Salpetersäure gelöst und unter mehrmaligem Nachspülen mit Wasser in einen Meßkolben von 100 ccm überführt. 5 bzw. 10 ccm dieser Lösung werden zur kolorimetrischen Bestimmung in einen Meßkolben von 25 ccm gebracht, während in einen zweiten gleichen Meßkolben 10 ccm einer Wismutstandardlösung mit einem Wismutgehalt von 0,114 mg, entsprechend 0,03 mg Natrium, gefüllt werden. Sodann kommen in jeden Meßkolben 5 ccm einer etwa 1proz. Gummiarabikumlösung und schließlich frisch bereitetes Schwefelwasserstoffwasser. Dadurch wird das in der Lösung vorhandene Wismut als braunes Wismutsulfid ausgefällt, das durch das Gummiarabikum in kolloidaler Lösung gehalten wird. Die Braunfärbungen werden dann im Kolorimeter verglichen und daraus der Natriumgehalt der Versuchslösung unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung berechnet[1]).

b) *Kalium.*

Kalium wird mit Natrium-Kobalt-Nitrit als schwer lösliche Kaliumverbindung ausgefällt. Da aber Ammonsalze dieselbe Reaktion zeigen und die entsprechenden Ammoniumsalze genau so schwer löslich sind wie die des Kaliums, muß das Ammoniak, das sich bei der Veraschung stickstoffhaltiger organischer Substanzen in größerer Menge bildet, zuerst entfernt werden. Zu diesem Zwecke gibt man zu 2 ccm der verdünnten Aschenlösung in einem Zentrifugenglas so lange Natronlauge, bis die Lösung gegen Lackmus deutlich alkalisch reagiert. Braucht man hierzu eine größere

---

[1]) Bezüglich Herstellung der Reagenzien und weiteres Verfahren vgl. *Pincussen*, Mikromethodik, 3. Auflage.

Menge Natronlauge, so ist diese auf ihren häufig vorhandenen Kaliumgehalt zu prüfen und der gefundene Wert in die spätere Berechnung einzusetzen. Die alkalisch gemachte Lösung stellt man 2 bis 3 Minuten in siedendes Wasser, nimmt sie dann heraus und läßt abkühlen. Nach dem Abkühlen gibt man einen Tropfen m-Nitrophenol als Indikator zu und titriert so lange mit n/10 Schwefelsäure, bis die Gelbfärbung verschwindet. Aus dieser Lösung kann jetzt das Kalium ausgefällt werden. Man versetzt die Lösung mit 2 ccm Natriumkobaltnitritlösung, mischt gut durch und läßt etwa 2 Stunden stehen. Während dieser Zeit fällt das Kalium als Kaliumkobaltnitrit (Kaliumhexanitrokobaltiat) aus.

$$3\,KCl + Na_3[Co(NO_2)_6] = K_3[Co(NO_2)_6] + 3\,NaCl.$$

Nach Zugabe von etwas Wasser zentrifugiert man den Niederschlag scharf ab, gießt die überstehende Flüssigkeit vorsichtig fort, mischt mit wenig Wasser und zentrifugiert wieder. Dies wird so oft wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren farblos ist, was meist nach drei Malen erreicht ist. Das Waschwasser wird wieder abgegossen und 5 ccm n/50 Kaliumpermanganat und 1 ccm 20proz. Schwefelsäure zugesetzt. Das Glas wird dann 2 Minuten in siedendes Wasser gestellt. Sollte die Rotfärbung danach verschwunden sein, so gibt man unter Umrühren nochmals eine gemessene Menge n/50 Kaliumpermanganat zu, bis die Rotfärbung, auch nach Eintauchen in kochendes Wasser, bestehen bleibt. Man achte darauf, daß sich der gelbe Niederschlag vollkommen löst und daß das Glas nicht zu lange in dem Wasserbade bleibt. Man entfärbt dann die Lösung durch Zusatz einer gemessenen Menge n/50 Oxalsäure und titriert aus einer Mikrobürette mit n/50 Kaliumpermanganat, bis eine Rotfärbung auftritt, die mindestens eine Minute lang bestehen bleibt. Die im ganzen zur Oxydation zugesetzte Menge n/50 Kaliumpermanganat (die NO_2-Gruppe wird zu NO_3 oxydiert) minus der zugesetzten Menge n/50 Oxalsäure ergibt, multipliziert mit 0,142, den Kaliumgehalt der verwandten 2 ccm Lösung in Milligrammen.

c) Calcium.

Calcium wird in essigsaurer Lösung als Calciumoxalat gefällt und die Oxalsäure mit Permanganat titrimetrisch bestimmt. Um, wie es für die quantitative Fällung erforderlich ist, das gesamte Calcium in Acetat umzuwandeln, versetzt man in einem Zentrifugenglas eine bestimmte Menge der Lösung mit Ammoniak, bis kein weiterer Niederschlag entsteht, und säuert danach mit verdünnter Essigsäure wieder an, wobei sich der Niederschlag wieder völlig lösen muß. Zu der essigsauren Lösung gibt man 2 bis 3 ccm gesättigte Ammoniumoxalatlösung und läßt 1 bis 2 Stunden stehen. Danach wird der gebildete Niederschlag von Calciumoxalat abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit für die Magnesiumbestimmung in ein anderes Zentrifugenglas überführt. Der Niederschlag selbst wird durch Aufwirbeln mit Wasser und darauf folgendes Zentrifugieren gewaschen und das Waschwasser zur Magnesiumfraktion gefügt. Nachdem man dies zweimal wiederholt hat, löst man den Niederschlag in etwa 5 ccm verdünnter Schwefelsäure, erwärmt im Wasserbade auf 70 bis 80° und titriert aus einer Mikrobürette mit n/100 Kaliumpermanganat bis zur Rotfärbung. Den Calciumgehalt kann man daraus ermitteln, daß 1 ccm n/100 Kaliumpermanganat 0,2 mg Calcium entspricht.

d) Magnesium.

Aus der von Calcium befreiten Lösung wird das Magnesium als Magnesiumammoniumphosphat ($MgNH_4PO_4\ 6H_2O$) ausgefällt und der Phosphor kolorimetrisch bestimmt. Die bei der Calciumausfällung überstehende Lösung + erstes Waschwasser überführt man in ein anderes großes, unten konisches Zentrifugenglas und versetzt mit 2 ccm einer 10proz. Lösung von Ammoniumphosphat und 3 ccm 25proz. Ammoniaks. Man überzeuge sich davon, daß die Lösung deutlich ammoniakalisch riecht, vermeide aber auch einen zu großen Überschuß von Ammoniak, weil sonst Ammoniumphosphat und Magnesiumhydroxyd mit ausfällt. Man reibt nun die Glaswände mit einem Glasstab, um die Ausfällung zu begünstigen, verschließt mit einem Kork und läßt 12 Stunden stehen. Ist sehr wenig Magnesium vorhanden, so empfiehlt es sich, die Lösung 24 Stunden stehenzulassen. Man zentrifugiert nun den gebildeten Niederschlag von Magnesiumammoniumphosphat ab und wäscht ihn durch mehrmaliges Zentrifugieren mit 2proz. Ammoniak. Als letzte Waschflüssigkeit nimmt man eine Mischung von 20 Teilen 25proz. Ammoniak und 80 Teilen 96proz. Alkohol und stellt das Zentrifugenglas danach in siedendes Wasser, bis die noch vorhandene Flüssigkeit vollständig verdampft ist. Den trockenen Niederschlag löst man in 1 ccm n/10 Salzsäure und überführt die Lösung unter mehrmaligem Nachspülen in einen Meßkolben von 50 ccm. Sollte sich der Niederschlag in der Salzsäure schwer lösen, so erwärme man das Glas etwas, gebe aber nicht mehr Salzsäure zu, weil die Acidität für die kolorimetrische Bestimmung eine sehr wichtige Rolle spielt. Spuren bleiben fast immer zurück. (Es wird sich um Verunreinigungen handeln, vielleicht Glasstaub vom Reiben der Glaswände. Jedenfalls spielt dies weiter keine Rolle.) Von der auf 50 ccm aufgefüllten Lösung füllt man 10 bzw. 20 ccm (die Menge richtet sich nach dem Magnesiumgehalt) in einen Meßkolben von 25 ccm, gibt je 1 ccm Molybdänsäure- und Hydrochinonlösung und nach einigen Minuten 1 ccm Carbonatsulfitlösung zu und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Die entstandene Blaufärbung wird im Kolorimeter mit der Blaufärbung einer Phosphatlösung bekannter Konzentration verglichen, die man sich auf folgende Weise herstellt: Von der auf das Zehnfache verdünnten Phosphatstandardlösung[1]) bringt man in einen 25-ccm-Meßkolben 10 ccm mit einem Phosphorgehalt von 0,1 mg und behandelt die Lösung genau so wie die Magnesiumsalzlösung. Aus der kolorimetrischen Bestimmung ergibt sich direkt der Phosphorgehalt der Magnesiumammoniumphosphatlösung, woraus sich unter Zugrundelegung der Formel $MgNH_4PO_4 \cdot 6\,H_2O$, nach der 0,1 mg Phosphor 0,0784 mg Magnesium entspricht, der Magnesiumgehalt der Versuchslösung berechnen läßt.

e) Phosphorsäure.

Der Gesamtphosphor, der nach der Veraschung als Phosphat vorliegt, wird nach Zugabe einer Molybdänsäure-Strychninlösung, die mit dem Phosphat eine Trübung hervorruft, nephelometrisch bestimmt. Eine bestimmte Menge der stark verdünnten Aschelösung wird in einem 25-ccm-Meßkolben nach Zugabe von einigen Tropfen p-Nitrophenol bis zur gerade eintretenden Gelbfärbung neutralisiert und 5 ccm verdünnte Salpetersäure zugegeben. In einen zweiten Meßkolben derselben Größe gibt man 5 ccm

---

[1]) Vgl. Mikromethodik, S. 22.

der auf das Zehnfache verdünnten Phosphatstandardlösung und ebenfalls 5 ccm verdünnte Salpetersäure. Beide Kolben werden mit Wasser bis etwa 45 ccm gefüllt. Nun gibt man in jeden Kolben 2 ccm Molybdänsäure-Strychninreagens, schüttelt gut um, füllt mit Wasser bis zur Marke auf und läßt eine halbe Stunde stehen. Nach dieser Zeit werden die entstandenen Trübungen im Nephelometer verglichen und aus den gefundenen Werten der Phosphatgehalt der Versuchslösung berechnet (5 ccm der verdünnten Phosphatlösung enthalten 0,03 mg Phosphat).

Die Menge der Lösung, die man zu dieser Bestimmung nehmen soll, kann allgemein gar nicht angegeben werden. Auf jeden Fall richte man es so ein, daß der Phosphatgehalt der angewandten Versuchslösung 0,06 mg, d. h. das Doppelte wie in der Vergleichslösung, nicht übersteigt. Findet man bei der nephelometrischen Ablesung größere Differenzen, so ist die Bestimmung mit der halben Menge zu wiederholen. Übersteigt nämlich der Phosphatgehalt 0,06 mg, so ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß der bis dahin kolloidal vorhandene Niederschlag ausflockt, wodurch ein nephelometrischer Vergleich unmöglich gemacht wird.

Will man den anorganischen Phosphor getrennt von dem Lipoidphosphor bestimmen, so muß man eine genau abgewogene Menge der Ursubstanz im Soxhlet-Extraktionsapparat 8 bis 10 Stunden mit Äther extrahieren. In dem Extrakt hat man dann den Lipoidphosphor und in dem Rückstand den anorganischen Phosphor, der in der beschriebenen Weise nach vorheriger Veraschung bestimmt wird.

f) Halogene.

In der Lösung, die man bei der oben beschriebenen Veraschung erhalten hat, kann man eine Halogenbestimmung nicht vornehmen. In den meisten Fällen wird man darin gar keine Halogene finden, weil diese durch die Behandlung, der die Substanz beim Veraschen unterworfen wird, vollständig verjagt werden. Man muß deshalb für die Halogenbestimmung eine Sonderveraschung vornehmen. In einen Mikrokjeldahlkolben bringt man eine genau gewogene Menge Untersuchungssubstanz. Dazu gibt man etwas Salpetersäure und 5 ccm n/50 Silbernitratlösung. Nun wird die Veraschung in derselben Weise ausgeführt wie sonst. Das Halogen setzt sich sofort, wenn es von den organischen Bindungen gelöst wird, mit dem Silbernitrat um und bildet das unlösliche und nicht flüchtige Silberhalogenid. Nach Beendigung der Veraschung wird der mineralische Rückstand in verdünnter Salpetersäure gelöst und unter Nachspülen quantitativ in eine glasierte Porzellanschale überführt. In dieser Lösung bestimmt man, nachdem man etwas Eisenalaun $[FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12\,H_2O]$ zugegeben hat, das unverbrauchte Silbernitrat, indem man aus einer Mikrobürette mit n/50 Ammoniumrhodanid bis zur Rotfärbung titriert. Die zur Bildung von Halogensilber verbrauchte Menge Silbernitrat ergibt, multipliziert mit 0,71, die Menge Halogen, die die Probe enthielt.

Der Faktor 0,71 stimmt genau nur für die Bestimmung von Chlor. Hat man bedeutende Mengen von Brom oder Jod, so muß man den dafür in Betracht kommenden Faktor anwenden und unter Umständen eine Trennung der verschiedenen Silberhalogenide vornehmen.

Sollte bei der Titration schon durch den ersten Tropfen Ammoniumrhodanid eine Rotfärbung entstehen, die nicht sofort wieder verschwindet, so ist dies ein Zeichen, daß die zugesetzte Menge Silbernitrat nicht ausreichend war, und die ganze Veraschung muß mit einer größeren Menge Silbernitrat wiederholt werden.

g) *Beleganalysen.*

Je 2 ccm Salzlösung werden mit 0,5 g reinster Glucose gemischt und die Veraschung wie oben vorgenommen.

Gesuchter Stoff	In 100 ccm Wasser gelöstes Chlorid	Zugefügt	Gehalt		Fehler
			gefunden	berechnet	
	g	ccm	mg	mg	Proz.
Natrium	0,6290	2	4,80	4,95	— 3
Kalium	0,0536	2	0,546	0,562	— 3
Calcium	0,0814	2	0,594	0,589	+ 1
Magnesium . . .	0,1088	2	0,606	0,628	— 3
Chlorid	0,6290	2	7,56	7,63	— 1

h) *Beispiele.*

Als Zahlenbeispiel soll die Analyse von gekochten Kartoffeln genommen werden. Zuerst bestimmt man den Wassergehalt als den Gewichtsverlust, den eine genau abgewogene Menge bei mehrstündigem Stehen in dem auf 100° erhitzten Trockenschrank erfährt.

Kartoffeln, feucht + Wägegläschen	15,0998 g
,, trocken + ,, ...	12,8000 g
Gewichtsverlust = Wassergehalt.	2,2998 g
Wägegläschen + Kartoffeln, feucht	15,0998 g
,, leer	12,1144 g
Kartoffeln, feucht	2,9854 g
Gewichtsverlust beim Trocknen	2,2998 g
Wassergehalt der gekochten Kartoffeln	77,04 Proz.

Man trocknet nun ungefähr 15 g in derselben Weise, pulvert fein und wiegt davon auf der analytischen Wage 2 g ab, die man dann nach der angegebenen Methode verascht. Die wässerige, schwach angesäuerte Lösung wird dann, unter Umständen durch ein Filter, in einen Meßkolben von 50 ccm überführt, der dann mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt wird.

Der Natriumgehalt wurde in einer Flüssigkeitsmenge von 5 ccm bestimmt. Das ausgefällte und gereinigte Natrium-Wismut-Komplexsalz wurde aufgelöst und die Lösung auf 100 ccm aufgefüllt. Mit 10 ccm dieser Lösung, d. h. 0,5 ccm der Untersuchungsflüssigkeit, wurde der kolorimetrische Vergleich vorgenommen. Dabei ergab sich Farbengleichheit, wenn die Schichtdicke der Versuchslösung 32 cm und die der Vergleichslösung 30 cm war. Der Natriumgehalt ist dann $x = 0{,}03 \cdot \frac{32}{30} = 0{,}032$ mg Natrium in 0,5 ccm. In der Gesamtmenge von 50 ccm ist dann 0,032 . 100 = 3,2 mg Natrium = 0,16 Proz.

Zur Bestimmung des Kaliums, das in Kartoffeln in großer Menge vorhanden ist, wurde 1 ccm der Lösung, entsprechend 0,04 g Trockensubstanz, genommen. Zu dem gereinigten Niederschlag wurden dann 5 ccm n/50 Kaliumpermanganat, darauf 1 ccm n/50 Oxalsäure und bei der Titration 0,69 ccm n/50 Permanganat zugesetzt. Es wurden also im ganzen 4,69 ccm n/50 Kaliumpermanganat verbraucht, d. h. 0,04 g Trockensubstanz enthielten 4,69 . 0,142 = 0,666 mg Kalium. Der Kaliumgehalt der trockenen Kartoffeln ergibt sich daraus zu 1,67 Proz.

Der Calciumgehalt der Kartoffeln ist wesentlich kleiner; deshalb wurde das Calcium aus 5 ccm Lösung ausgefällt. Bei der Titration wurden 0,81 ccm n/100 Kaliumpermanganat zugesetzt, 0,2 g Trockensubstanz enthalten also 0,16 mg oder 0,08 Proz. Calcium.

Die von Calcium befreite Lösung wurde dann gleich weiter auf Magnesium untersucht. Das ausgefallene Magnesiumammoniumphosphat wurde in n/10 Salzsäure gelöst und auf 50 ccm aufgefüllt. Davon wurden zur kolorimetrischen Bestimmung 20 ccm, die 0,08 g Trockensubstanz entsprechen, verwandt. Aus den gefundenen Werten ergab sich dann die Gleichung $x = 0{,}1 \cdot \frac{37{,}5}{47{,}1} = 0{,}0797$ mg Phosphor. Durch Multiplikation mit 0,784 erhielt man den Magnesiumgehalt von 0,08 g Trockensubstanz, nämlich 0,0624 mg = 0,08 Proz.

Der Phosphorgehalt der Kartoffeln ist ein sehr großer, und man muß deshalb den nephelometrischen Vergleich in sehr großer Verdünnung vornehmen. 5 ccm, entsprechend 0,2 g Trockensubstanz, werden auf 100 ccm aufgefüllt und davon 10 ccm weiter genau nach der Vorschrift verarbeitet. Der nephelometrische Vergleich führte dann zu der Formel $x = 0{,}03 \cdot \frac{14{,}5}{25}$ = 0,174 mg Phosphat. In der Gesamtmenge sind dann 100 . 0,174 = 17,4 mg Phosphat, das sind 0,87 Proz.

Für die Chlorbestimmung wurden 0,5 g getrocknete Kartoffeln nach Zusatz von 5 ccm n/50 Silbernitrat verascht. Es wurde dann mit 1,42 ccm n/50 Ammoniumrhodanid bis zur Rotfärbung zurücktitriert, es waren also 3,58 ccm n/50 Silbernitrat verbraucht. Der Chlorgehalt ist danach 3,58 . 0,71 = 2,54 mg Chlor in 0,5 g Trockensubstanz oder 0,51 Proz.

Über eiweißspaltende Fermente der Placenta.

Von

Bernhard Arinstein.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Nach der von *Pincussen* (1) ausgesprochenen Anschauung, die auf der von *Jacoby* (2) gefundenen Heterolyse basiert, beruht die spaltende Wirkung des Blutes gegenüber Eiweißkörpern und deren Abbauprodukten auf dem Freiwerden von Fermenten aus zugrunde gegangenen Zellen.

Wie besonders von *Pincussen* ausgeführt worden ist, ist diese Tatsache zugleich ein Grund dafür, daß eine Spezifität, wie sie von *Abderhalden* postuliert und in vielen Untersuchungen auch gefunden worden ist, nicht immer erkennbar wird, weil in vielen Fällen nicht nur Zellen einer Art zugrunde gehen. Sehr häufig gehen, abgesehen von der stets stattfindenden Mauserung, die sich ja ebenfalls nachweisen läßt — vgl. die Untersuchungen von *Pincussen* und Mitarbeitern über den Abbau von Hundepepton durch Hundeserum —, Zellen verschiedener Art in größerem Maße zugrunde. Während es wahrscheinlich ist, daß aus manchen Zellen Fermente herstammen, welche ganz spezifisch eingestellt sind, ist es sicher, daß z. B. die aus den Leucocyten freigesetzten Fermente ganz unspezifisch eingestellt sind.

Die Lehre der von *Abderhalden* zunächst als Abwehrfermente bezeichneten Blutfermente hat ihren Ausgang genommen von der Gravidität, bei welcher *Abderhalden*, *Freund* und *Pincussen* das Bestehen ganz spezifischer, gegen Placentapepton eingestellter Peptidasen erweisen konnten. Die Entstehung dieser Fermente beruht wahrscheinlich auf dem oben skizzierten Mechanismus. Wenn also auch die Theorie dieser Schwangerschaftsreaktion wohl gegründet erscheint — es handelt sich um Fermente, die aus den zugrunde gegangenen Zellen der Placenta stammen —, so haben doch Nachuntersuchungen gezeigt, daß durchaus nicht alle Autoren imstande waren, die Erscheinung in gleicher Weise wie *Abderhalden* und seine Schule zu reproduzieren. In einer zu gleicher Zeit erscheinenden Arbeit aus dem hiesigen Institut wird auf solche Fälle einzugehen sein.

Der Plan dieser Arbeit war der folgende. Da anzunehmen ist, daß die Blut-Fermente bei der Gravidität aus zugrunde gehenden Placentazellen stammen, so sollte versucht werden, den Vorgang dieser Ferment-

bildung künstlich zu reproduzieren, und zwar durch Autolyse der Placenta. Die im Autolysensaft vorhandenen Fermente sollten nun auf ihr Abbauvermögen, speziell ihre Spezifität geprüft werden, und zwar sollte einerseits die tryptische Wirkung, andererseits die peptidasische Wirkung einer Prüfung unterzogen werden. Gegen diese Versuchsanordnung könnte eigentlich nur ein Einwand gemacht werden, nämlich der, daß im letzten Monat die *Abderhalden*sche Reaktion im Serum sehr gering ist bzw. ganz fehlt, daß also eine ausgewachsene Placenta vielleicht die Fermente nicht in genügender Menge enthalten könnte. Es wird gelegentlich zu prüfen sein, ob jüngere Placenten, deren Beschaffung naturgemäß immer etwas schwierig ist, sich ebenso verhalten wie ausgewachsene. Es ist aber bis auf weiteres anzunehmen, daß die fehlende *Abderhalden*sche Reaktion im zehnten Monat nicht auf das Fehlen von Fermenten in der Placenta zurückzuführen ist, sondern wohl darauf, daß in der allerletzten Zeit der Stoffwechsel der Placenta weniger lebhaft, der Abbau also in geringerem Maße erfolgt. Unklar ist auch der Einfluß von Hemmungsstoffen.

Die Versuchsanordnung war durch diese Erwägungen gegeben: Es war zu prüfen: Autolysensaft gegenüber spezifischem Placentapepton und gegenüber unspezifischem Wittepepton, gegenüber unspezifischem Eiweiß (Casein) und gegenüber spezifischem Placentaeiweiß.

Was die Herstellung der Substrate betrifft, so erfolgt die Darstellung des Placentaeiweißes nach der von *Pregl* und *de Crinis* angegebenen Methode, nach der ein von Pepton freies, feines, fast farbloses Placentapulver erhalten

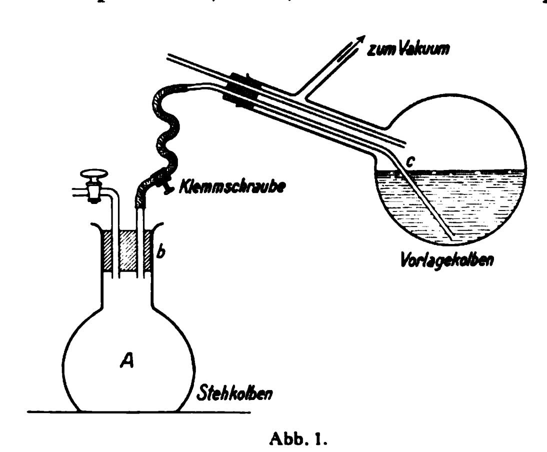


Abb. 1.

wird. Die Darstellung des Placentapeptons folgte im wesentlichen nach den Angaben des *Abderhalden*schen Institutes; es sei nur eine Vorrichtung erwähnt, welche beim Eindampfen der Peptonlösung vermeidet, die Apparatur auseinanderzunehmen, sobald der Vorlagekolben gefüllt ist. Diese Vorrichtung bestand (s. Abb. 1) darin, daß ein gewöhnlicher 1-Liter-Steh-

kolben mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen wurde, durch dessen eine Bohrung ein kurzes, durch einen Glashahn verschließbares Glasrohr durchgeführt wurde. Durch die zweite Bohrung war ein kurzes Glasrohr *b* geführt, welches durch einen Vakuumschlauch mit Klemmschraube mit einem Glasrohr *c* in Verbindung stand, welches durch eine zweite Bohrung im Gummistopfen des Vorlagekolbens bis fast auf dessen tiefsten Punkt durchgeführt war. Beim Anstellen des Vakuums war die Klemmschraube geöffnet und der durch den Schlauch mit dem Inneren des Destillationsapparats in Verbindung stehende Stehkolben gleichfalls evakuiert. War nur die Vorlage genügend weit mit Wasser gefüllt, so wurde das Vakuum stark vermindert, und der höhere Druck im Innern des Vorlagekolbens drückte nun durch das Glasrohr die Flüssigkeit in den Stehkolben herein. Um weiteren Druckverlust zu vermeiden, wurde nun die Klemmschraube geschlossen und durch den Glashahn in dem Stehkolben Atmosphärendruck hergestellt. Der Kolben konnte nun abgenommen, entleert und wieder angesetzt werden.

Wie bekannt, ist die Ausbeute bei der üblichen Peptondarstellung außerordentlich gering, vor allem infolge der starken Absorption durch den Bariumsulfatniederschlag. Bei der Schwierigkeit des Eindampfens großer Mengen lohnt es kaum, die Niederschläge weiter auszuwaschen, so daß man sich eben mit den geringen Ausbeuten zufrieden geben muß.

Zur Herstellung des Placentaautolysats wurde so verfahren, daß die ganz frischen Placenten von der Nabelvene aus blutfrei gewaschen wurden und die fast weiße Placenta durch den Fleischwolf geschickt wurde. Der so erhaltene Gewebebrei wurde durch Aufschwemmen mit Wasser und Dekantieren noch zweimal ausgewaschen und dann mit 750 ccm Wasser pro Placenta im Erlenmeyerkolben unter Überschichtung mit einer dicken Toluolschicht in den Brutschrank bei 37° gestellt. Er blieb dort 48 Stunden und länger, wobei darauf geachtet wurde, eventuell verdampftes Toluol durch neues zu ersetzen. Darauf wurde eine gewisse Menge entnommen, durch Dekantieren von den gröbsten Teilen getrennt und die mäßig getrübte Lösung gut zentrifugiert. Es wurde so eine klare oder fast klare Lösung gewonnen, die sowohl für die optischen wie auch für die rein chemischen Versuche angewendet wurde.

Für die Bestimmung der Peptidasen diente die optische Methode, die von *Abderhalden*, *Pincussen* u. a. wiederholt beschrieben worden ist. Benutzt wurde ein dreiteiliger Polarisationsapparat von *Landolt-Lippich* mit monochromatischem Licht. Leider stehen im hiesigen Institut nicht genügend Polarisationsröhren mit Doppelmantel, ebensowenig die von *Abderhalden* angegebene Heizvorrichtung zur Verfügung, so daß der Ansatz der Mischungen in Kölbchen erfolgte, denen zu bestimmten Zeiten gewisse Mengen entnommen wurden. Die für die Fermentwirkung erforderlichen Reaktionen wurden hergestellt mit Hilfe der bekannten Puffergemische von Phosphat, Citrat, Borat. Neben den aktiven Versuchen liefen regelmäßig Kontrollen mit durch halbstündiges Erhitzen auf 60° inaktivierter Lösung, in einzelnen Fällen auch Kontrollen mit Pepton allein.

Die Gegenwart von Peptidasen gegenüber Placentapepton ergibt sich aus folgendem orientierenden Versuch. Angesetzt 6 ccm 5 proz. Peptonlösung, 10 ccm m/15 Phosphatgemisch, 10 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung, 4 ccm Autolysensaft, so daß die ganze Lösung 1 Proz. Pepton enthielt. Gläser 2 und 4 waren inaktive Kontrollen, Ablesung im 189,4-mm-Rohr bei 20°.

Zeit	1. p_H 5,9	2. p_H 5,9	3. p_H 7,7	4. p_H 7,7
12h	—0,76	—0,76	—0,76	—0,76
2h 30'	—0,70	—0,76	—0,72	—0,76
11h des nächsten Tages	—0,67	—0,77	—0,67	—0,76
Differenz	+0,09	—0,01	+0,09	∓0,00

Da die Beobachtung ergab, daß Phosphatgemische von einem p_H von etwa 6 bis 7,6 sowohl in der reinen Peptonlösung als auch im Autolysensaft, wenn auch hier schwächer, eine Ausflockung bewirkten, wurde die Wirkung der Salzkonzentrationen und der [H˙] auf die Ausflockung und die optische Drehung untersucht. m/3 Lösungen von primärem und sekundärem Phosphat wurden in verschiedenem Verhältnis gemischt und in Reihen auf die halbe, viertel usw. Konzentration gebracht. Je 2 ccm einer 2proz. Peptonlösung in destilliertem Wasser und 2 ccm Phosphatmischung bzw. 2 ccm Placentaautolysensaft und 2 ccm Phosphatmischung wurden zusammengebracht, die Flockung geschätzt und nach dem Abzentrifugieren der Flockung die Drehung im 189,4-mm-Rohr gemessen.

a) Pepton.

Verhältnis prim. : sek.	Konzentration des Phosphats									
	m/3		m/6		m/12		m/24		m/48	
0:10	+++	—0,75	+++	—0,75	+++	—0,76	++	—0,76	++	—0,76
2: 8	+++	—0,76	+++	—0,76	++	—0,74	++	—0,76	++	—0,75
4: 6	++	—0,76	++	—0,76	++	—0,76	+	—0,76	+	—0,76
6: 4	++	—0,76	++	—0,76	++	—0,76	+	—0,76	kaum	—0,75
8: 2	++	—0,75	++	—0,76	++	—0,76	+	—0,76	kaum	—0,76

b) Autolysat.

Verhältnis prim. : sek.	Konzentration des Phosphats				
	m/3	m/6	m/12	m/24	m/48
0:10	+++	+++	++	+	+
2: 8	+++	+++	++	+	+
4: 6	+++	+++	++	++	+
6: 4	+++	+++	++	++	kaum
8: 2	+++	+++	++	+	kaum

Die optische Drehung ist fast unmerklich, etwa — 0,02°, also innerhalb der Fehlergrenzen der Ablesung. Es kam nun darauf an, das Optimum der Fermentwirkung festzustellen. Sie wurde daher bei wechselndem p_H von 3,0 bis 9,0 geprüft. Die Ansätze waren die folgenden.

A. 4 ccm 5proz. Peptonlösung, 4 ccm Puffer (m/10 Citrat, m/15 Phosphat, m/10 Borat), 10 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung, 2 ccm Autolysesaft.

B. 4 ccm Peptonlösung, wie oben, 4 ccm Puffer, wie oben, 10 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung, 2 ccm Wasser.

C. 4 ccm Pufferlösung, 4 ccm Wasser, 10 ccm Kochsalzlösung, 2 ccm Autolysesaft.

Alle Lösungen wurden sofort abgelesen und blieben dann 24 Stunden im Brutschrank stehen, worauf eine zweite Ablesung erfolgte. Die Resultate gibt folgende Tabelle:

p_H:	3			4			5		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Anfang . .	- 0,82	- 0,81	- 0,08	- 0,82	- 0,82	- 0,08	- 0,82	- 0,81	- 0,08
Schluß . .	- 0,40	- 0,74	- 0,00	- 0,70	- 0,76	- 0,00	- 0,72	- 0,78	- 0,04
Differenz .	+ 0,12	+ 0,07	+ 0,08	+ 0,12	+ 0,06	+ 0,08	+ 0,10	+ 0,03	+ 0,04

p_H:	6			7			8			9		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Anfang	- 1,04	- 1,04	- 0,0	- 1,04	- 1,04	0,0	- 1,04	- 1,04	0,0	- 1,04	- 1,04	0,0
Schluß	- 0,88	- 1,02	0,0	- 0,82	- 1,05	0,0	- 0,81	- 1,04	0,0	- 0,84	- 1,02	0,0
Differ.	+0,16	+0,02	0	+0,22	- 0,01	0	+0,23	0,0	0	+0,20	+0,02	0

Nach Maßgabe dieser Tabelle liegt für die hier in Frage kommende Peptidase das Maximum bei p_H 7 bis 8. Es sei noch darauf hingewiesen, daß die in der Reihe A bei den hohen Aciditäten auftretenden Drehungsänderungen im wesentlichen oder wahrscheinlich sogar vollständig durch hydrolytische Säurespaltung bedingt sind, wie auch die Ergebnisse der Stäbe B und C zeigen.

Es fragt sich nun, ob diese Drehung einem spezifischen Ferment zuzuschreiben ist oder ob es sich um eine allgemeine peptidasische Wirkung handelt. Zu diesem Zwecke wurde unter sonst gleichen Bedingungen das Verhalten des Autolysats gegenüber einer Lösung von Wittepepton geprüft.

Die angewandte Lösung war 1proz., die Ansätze genau wie in dem vorigen Versuch; infolge der schwereren Löslichkeit des Wittepeptons konnte nur von einer 2proz. Lösung ausgegangen werden, so daß die Mischung A bestand aus 10 ccm 2proz. Peptonlösung, 4 ccm Pufferlösung, 4 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung, 2 ccm Autolysesaft.

Die Lösungen B sind entsprechend. Der Peptongehalt entsprach also mit 1 Proz. dem beim Placentapeptonversuch.

Die Resultate dieses Versuchs werden durch folgende Tabelle gegeben, aus der sich deutlich ein erhöhter Abbau zwischen p_H 5 und 7 ergibt, mit starkem Abfall nach beiden Seiten. Die Abnahme bei p_H 6 dürfte auf einem Versuchsfehler beruhen; leider war es aus äußeren Gründen nicht möglich, diesen Versuch zu wiederholen.

p_H:	3			4			5		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0h	—0,85	—0,85	0	—0,85	—0,85	0	—0,85	—0,85	0
nach 48h . .	—0,74	—0,85	0	—0,76	—0,85	0	—0,50	—0,80	0
Differenz	+ 0,11	0	0	+ 0,09	0	0	+ 0,35	+ 0,05	0

p_H:	6			7			8			9		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0h . .	—0,85	—0,85	0	—0,85	—0,85	0	—0,85	—0,85	0	—0,85	—0,85	0
nach 48h	—0,65	—0,80	0	—0,55	—0,80	0	—0,78	—0,85	0	—0,80	—0,85	0
Differ.	+ 0,20	+ 0,05	0	+ 0,30	+ 0,05	0	+ 0,07	0	0	+ 0,05	0	0

Aus dem verschiedenen Optimum für die Wirkung des Autolysats gegenüber dem spezifischen Placentapepton (Optimum p_H 7 bis 8) und dem unspezifischen Wittepepton (Optimum p_H 5 bis 7) darf auf das Vorhandensein eines spezifischen Ferments im Autolysensaft der Placenta geschlossen werden, was wohl als Stütze der anfangs skizzierten Theorie gelten dürfte.

Während sich also bei der Wirkung der Peptidase des Autolysensaftes ein ziemlich klares Bild ergibt, liegen die Verhältnisse erheblich schwieriger bei den Versuchen, die bezwecken sollten, den Nachweis einer spezifischen Tryptase zu erbringen.

Die Versuche waren so angesetzt, daß eine gewisse Menge Placentaeiweiß durch Zusatz der Pufferlösung in der Wärme aufgequollen wurde und nach Abkühlung im Hauptversuch zur Mischung 2 ccm Autolysensaft, im Kontrollversuch B 2 ccm Wasser zugefügt wurden, während die Kontrolle C kein Placentaeiweiß, sondern nur Puffer und Autolysensaft enthielt. Die Lösungen blieben dann 2 Tage im Brutschrank unter einer dicken Toluolschicht stehen, worauf nach der von *Pincussen* angegebenen Methode verfahren wurde: nach Filtration durch ein angefeuchtetes Filter und reichlichem Nachwaschen wurde enteiweißt und in einem aliquoten Teil des Filtrats der inkoagulable Stickstoff bestimmt. Sämtliche Versuche, welche mit Placenta ausgeführt wurden, ergaben, daß der inkoagulable Stickstoff im Vollversuch A geringer war als in der Summe der Kontrollversuche B und C. Vor allem wurde beobachtet, daß der Autolysensaft, wie ja vorauszusehen, erhebliche Mengen von nichtkoagulablem Stickstoff enthielt. Zur Orientierung füge ich eine Tabelle bei, bei welcher im Vollversuch 100 mg Placentaeiweiß, 2 ccm Puffer und 2 ccm Autolysensaft angewandt waren, während die B-Kontrolle ohne Autolysat, die C-Kontrolle ohne Eiweiß angesetzt war. Naturgemäß lassen sich bei Lage der Dinge keinerlei Schlüsse bezüglich einer optimalen Fermentwirkung ziehen.

p_H:	3			4			5		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C
mg N . . .	1,0	0,55	1,05	1,1	0,45	1,1	1,05	0,55	·/·

p^H:	6			7			8			9		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
mg N .	1,0	0,45	1,0	0,85	0,60	0,90	1,15	0,50	1,05	1,1	0,55	1,15

Der Grund für dieses Verhalten liegt zweifellos in Absorptionsverhältnissen, die bekanntlich besonders bei der großen Oberflächenentwicklung eine erhebliche Rolle spielen, wie *Anciães* kürzlich im hiesigen Institut gezeigt hat. Diese Adsorption kommt vor allem für die hochmolekularen Abbauprodukte in Frage. Ferner wäre noch zu berücksichtigen, ob nicht durch gegensätzliche Ladungen von Autolysat und Eiweiß Ausflockungen eintreten können.

Die Verhältnisse liegen etwas günstiger beim Casein, bei welchem die Oberflächenentwicklung erheblich geringer ist. Dementsprechend sind die gewonnenen Ergebnisse auch günstiger, wie die nachfolgende Tabelle zeigt.

p_H:	3			4			5		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C
mg N . . .	1,0	0,65	0,85	1,45	0,70	0,65	1,55	0,30	1,1

p_H:	6			7			8			9		
Versuch:	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
mg N .	1,45	0,50	1,1	1,85	0,35	0,90	3,1	0,65	1,1	1,30	0,65	1,30

Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie in dem vorhergehenden Versuch, mit der einzigen Ausnahme, daß statt 100 mg Placentaeiweiß 100 mg reinsten Caseins nach *Hammarsten* verwendet wurden. Es ist hier bei p_H 7 und 8 der inkoagulable Stickstoff des Vollversuchs größer als die Summe der beiden Kontrollen, bei p_H 7 0,6 mg, bei p_H 8 1,35 mg. Wir dürfen also hieraus das Vorhandensein einer gewöhnlichen Tryptase schließen.

Ob sich eine spezifische, auf Placentaeiweiß eingestellte Tryptase findet, läßt sich, wie gesagt, mit unseren Versuchen nicht entscheiden. Die Frage muß also vorläufig offen bleiben; die Versuche sagen weder für noch gegen diese Annahme etwas aus.

Literatur.

1) *L. Pincussen*, Deutsch. med. Wochenschr. 1914, S. 425. — 2) *M. Jacoby*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **8**, 446, 1903. — 3) *L. Pincussen*, diese Zeitschr. **51**, 107, 1913; *Pincussen* und *Petow*, ebendaselbst **56**, 319, 1913. — 4) *Abderhalden*, *Freund* und *Pincussohn*, Prakt. Ergebn. d. Geburtsh. u. Gyn. **2** (II), 367, 1909. — 5) *L. Pincussen*, diese Zeitschr. **132**, 242, 1922. — 6) *J. H. Cascão de Anciães*, ebendaselbst **144**, 179, 1924.

Der Ionenantagonismus als rein chemisches Problem.

(Zugleich ein Beitrag zur Frage der Ca-Ionisation.)

Von

Alexander Belák und **Eugen Szép.**

(Aus dem pharmakologischen Institut der k. ung. Stefan-Tisza-Universität in Debrecen.)

(Eingegangen am 2. Januar 1926.)

In der Entwicklung des vorliegenden Problems lassen sich zwei Phasen unterscheiden.

Die erste wird durch das *biologische Tatsachenmaterial* dargestellt: die allbekannten[1]) Befunde von *Ringer, Locke, Osterhout, Loeb, Lillie Bethe* u. a. gehören hierher. Es wurde durch genannte Forscher eine lange Reihe von Tatsachen erhoben, nach welchen verschiedene tierische und pflanzliche Lebewesen und deren Organe nur eine biologisch ausgeglichene, äquilibrierte Salzlösung auf die Dauer vertragen. Sie, vor allem aber *J. Loeb*, konnten auch feststellen, daß der springende Punkt dieser Äquilibrierung in der Anwesenheit von verschiedenen Kationen, neben einwertigen (Na, K) auch von zweiwertigen (Ca), zu suchen sei. Dabei kommt es nicht so sehr auf die absolute Menge als auf das Verhältnis derselben an.

Die Forschung nach dem Warum dieser Erscheinungen führt uns in die zweite Phase der Fragestellung, welche als *Deutung* als *Kolloidphänomen* bezeichnet werden kann. Um nicht in Wiederholung der ausführlichen Darstellung verschiedener Lehr- und Handbücher zu geraten, wollen wir auf nähere Literaturangaben verzichten und die allgemeine Auffassung dieser Vorgänge mit den Worten *Tschermaks*[2]) schildern: „Zur Frage nach der Grundlage des Ionenantagonismus sei bemerkt, daß dieser kein direkt chemischer ist, sondern in einer gegensätzlichen physikalisch-chemischen Wirkung auf gewisse kolloide Bestandteile der lebenden Substanz besteht.“ Im speziellen soll diese Kolloidwirkung nach den früheren Forschungen je nach den beteiligten Ionen eine zweisinnige und gegensätzliche sein. Gewisse Kationen — Na, K, Rb — haben eine lyophile, die Kolloide (Zellhaut) auflockernde, permeabilitätssteigernde Wirkung, während anderen — Ca, Mg — dementgegen lyophobe, die Kolloiddispersität zurückdrängende, gerbende, permeabilitätsvermindernde Wirkung zukommt. Demgegenüber

---

[1]) Zusammenfassende Darstellung und Literatur u. a. bei *Höber*, Physik. Chem. d. Zelle u. Gewebe, 4. Aufl., S. 521; *Tschermak*, Allgemeine Physiologie, S. 121. Berlin, Springer, 1924.

[2]) l. c., S. 128.

konnte nun *S. M. Neuschloss*[1]) an Lecithin- und Fermentlösungen neuerdings feststellen, daß ein prinzipieller Gegensatz zwischen der Wirkungsweise der verschiedenen Kationen nicht besteht, indem die Oberflächenspannung von Lecithinlösungen durch sämtliche untersuchten Salze ($NaCl$, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $AlCl_3$) gleichsinnig verändert wird. Die Oberflächenspannung wächst bei alleiniger Einwirkung eines Ions in jedem Falle an und durchläuft ein gewisses Maximum. Werden aber verschiedene Salze in bestimmten Verhältnissen miteinander kombiniert, so kommt es bei gewissen geeigneten relativen Konzentrationen zu einer Verminderung, ja sogar zu einer Vernichtung der erwähnten einseitigen Salzwirkungen.

Wichtig für uns ist nun die Beantwortung der Frage, auf Grund welches Mechanismus diese gegenseitigen Wirkungen zustande kommen? In den Mittelpunkt dieser Fragestellung wird selbstverständlich die Adsorbierbarkeit seitens der Kolloidoberfläche gestellt: Um Kolloidwirkungen zu entfalten, müssen die betreffenden Ionen adsorbiert werden. Es ist weiterhin begreiflich, wenn auch die Stärke dieser Adsorption Gegenstand verschiedener Betrachtungen gewesen ist, und man stellte Beziehungen zwischen dem Antagonismus und Lösungsdruck, Haftdruck usw. auf[2]). All diese Wege konnten aber in bezug auf den Grundvorgang keinen befriedigenden Aufschluß erteilen, denn das erste und wichtigste, was wir bei dieser Angelegenheit kennen sollen, ist das Schicksal der adsorbierten Ionen in dem Moment einer antagonistischen Beeinflussung. Die Kolloidchemie kennt wohl das Phänomen der Ionenverdrängung, worunter verstanden wird, daß adsorbierte Ionen durch andere ausgetauscht werden, d. h. ein Ion einem anderen den Platz räumt und ersteres an dem Adsorbens haften bleibt. Nach diesem Vorgang bleibt somit eine gewisse Ionenzahl oder Ionenvalenz an der adsorbierenden Oberfläche sitzen. Ein ähnlicher Vorgang kann nun in unserem Falle des Ionenantagonismus unmöglich obwalten, denn aus den erwähnten Untersuchungen von *Neuschloss* geht ganz deutlich hervor, daß die Grundwirkung, die Einzelwirkung sämtlicher in Betracht kommenden Ionen dieselbe ist und in einer Vergrößerung der Oberflächenspannung besteht. Würde nun z. B. ein Na-Ion durch das antagonistische Ca-Ion im Sinne der Ionenverdrängung einfach ausgetauscht, so würde daraus unmöglich eine Herabsetzung — zufolge der stärkeren Wirkung des zweiwertigen Ca-Ions —, eher eine Verstärkung der gleichsinnigen Ionenwirkung hervortreten. Auch der zweite mögliche Fall, daß nämlich das zweite, antagonistische Ion, beim Sitzenbleiben des ersteren adsorbiert werden sollte, kann aus dem erwähnten Grunde ausgeschlossen werden, denn jetzt würde anstatt der antagonistischen Gegenwirkung bestimmt eine gleichsinnige Mehrwirkung, eine additive Steigerung zustande kommen.

---

[1]) Kolloid-Zeitschr. 27, 292, 1920.
[2]) Siehe bei *Tschermak*, l. c.

Es bleibt nach den obigen Ausführungen keine andere Möglichkeit für das Verhalten der antagonistischen Ionen in bezug auf eine Kolloidoberfläche übrig, als daß ein bereits adsorbiertes — aktives — Ion im Moment einer antagonistischen Ionwirkung durch letzteres von der Oberfläche *vertrieben* wird, ohne seinen Platz einzunehmen, also *ohne* es zu *verdrängen*. Die Menge der adsorbierten Ionen wird dadurch überhaupt vermindert, und da nur adsorbierte Ionen einen Kolloideffekt auszuüben imstande sind, verhält sich somit eine Kolloidoberfläche in einem durch Antagonismus äquilibrierten Benetzungsmilieu, als wenn sie in destilliertem Wasser liegen würde. *Neuschloss*[1]) vertritt denselben Standpunkt, allerdings mit dem Unterschied, daß er von Ionenverdrängung spricht, während wir, um Mißverständnissen vorzubeugen, den dieser Auffassung mehr entsprechenden Ausdruck „*Ionenvertreibung*" für geeigneter halten und gebrauchen wollen.

Diese Auffassung hat bereits einen direkten experimentellen Beweis in der allerdings kurz und unvollständig gefaßten Arbeit von *Oijen*[2]) gefunden, welche wir als grundlegend für die Beurteilung unseres Problems betrachten wollen.

Oijen untersuchte die Cl-Adsorption an verschiedenen, nicht näher angegebenen Adsorbenzien aus reiner NaCl-Lösung, ferner aus Gemischen von NaCl + $CaCl_2$ und NaCl + KCl + $CaCl_2$ und fand die Cl-Adsorption in Anwesenheit von $CaCl_2$ bzw. KCl wesentlich vermindert. Es handelt sich also hier zwar nicht um die Adsorption der in Frage stehenden Kationen, sondern nur um deren gemeinsames Anion, wir können jedoch vermuten, daß mit dem Rückgang der Anionenadsorption auch die der Kationen eine Verminderung erfährt.

Mit der Feststellung, daß die bereits adsorbierten Ionen durch ihre Antagonisten aus der Oberfläche vertrieben werden, bzw. daß bei gleichzeitiger Einwirkung beider Ionenarten eine Adsorption überhaupt nicht oder nur in weit geringerem Maße zustande kommt, sind die dazu bewegenden Kräfte noch nicht aufgeschlossen. Es ist einleuchtend, daß der Angriffspunkt dieser Kräfte nicht in der Oberfläche selbst liegen kann, denn die antagonistischen Ionen gelangen im idealen Grenzfalle (günstiges Mengenverhältnis der Ionen) überhaupt nicht bis zur Oberfläche des Kolloids, sie werden ja gar nicht adsorbiert. Somit muß sich der ganze Kampf zwischen den beiden Ionenarten außerhalb der Oberfläche, d. h. im Salzmilieu selbst abspielen, und zwar in dem Sinne, daß durch das Zusammentreffen der antagonistischen Ionen ihre Ionisation gegenseitig zurückgedrängt wird. In dem Falle einer bereits erfolgten einseitigen Ionenadsorption entsteht dadurch ein von der Oberfläche gegen das Benetzungsmilieu gerichtetes Ionen-

[1]) l. c.. S. 297.
[2]) Diese Zeitschr. 87, 1918.

druckgefälle, wodurch die bereits adsorbierten Ionen die Oberfläche räumen und dieselbe in einem ionenfreien bzw. ionenarmen Zustande zurücklassen. Die Kolloidionenwirkung wird somit ganz oder teilweise ausgeschaltet.

Unsere Auffassung sagt somit aus, daß eine Kolloidwirkung nur durch freie Ionen auszulösen ist und daß der Wegfall einer solchen als die Folge des *primären* Rückganges der Ionisation zu betrachten ist. Das Problem des Ionenantagonismus hört damit auf, ein kolloidchemisches Phänomen darzustellen und geht in das Gebiet der reinen Chemie bzw. physikalischen Chemie der Lösungen über.

In diesem Zusammenhange sei auch erwähnt, daß auch *H. Wastl*[1]) einen Ionenantagonismus beschrieben hat, welcher in einer kolloidfreien Lösung vor sich geht. Die *Landolt*sche Reaktion, welche zwischen Jodsäure und schwefliger Säure in der Weise abläuft, daß nach dem Verschwinden der gesamten schwefligen Säure plötzlich freies Jod abgeschieden wird, wird durch Cl-, Br-, J-Anionen beschleunigt und durch SO_4, NO_3-Anionen gehemmt. Die beiden Ionenarten heben ihre Wirkungen gegenseitig auf.

Eine Beweisführung des Gesagten hat somit festzustellen, daß die Ionisation eines Salzes durch die Anwesenheit eines anderen zurückgedrängt wird, im speziellen — da es sich hier vor allem um Kationen handelt —, daß die Kationenkonzentration durch die Anwesenheit eines anderen Kations vermindert wird. Wir faßten vorläufig nur eine Ionenart, das Ca-Ion, ins Auge und glauben durch nachstehende Untersuchungen die obige Folgerung experimentell bewiesen zu haben.

Die eingeschlagene Methode war die von *Brinkman* und *van Dam*[2]) in der Ausführung von *H. Behrendt*[3]). Auf absolut gültige Zahlenwerte kann diese modifizierte Methode keinen Anspruch erheben, da Übersättigungen in der titrierten Flüssigkeit vorfallen können (s. weiter unten), zur Gewinnung von Verhältniszahlen ist sie aber recht geeignet. Da es beim Ionenantagonismus hauptsächlich auf das Verhältnis ankommt, so haben wir kein großes Gewicht auf die ganz genau bekannte Konzentration unserer Lösungen gelegt; es ist nur darauf angekommen, daß innerhalb der einzelnen Versuchsreihen mit derselben Lösung gearbeitet werde. Die Methode war kurz folgende: kleine, saubere, serologische Versuchsröhrchen beschickten wir mit einer bestimmten Menge (1 ccm) einer 0,012proz. Lösung von $CaCl_2$; dazu kamen steigende Mengen einer anderen zu untersuchenden Salzlösung und soviel destilliertes Wasser, daß das Volumen der Salzlösung auf 2 ccm ergänzt wird. Der ganze Inhalt des Röhrchens betrug somit 3 ccm. Diese Mischung wurde nun mit einer immer frisch filtrierten 0,0899proz. Ammoniumoxalatlösung titriert. Die Titration geschieht in einem Kästchen, welches aus zwei Abteilungen besteht; die erstere, größere enthielt eine kräftige elektrische Birne, die andere ein kleines Gestell für zwei Versuchsröhrchen. Beide Abteilungen sind durch eine Zwischenwand aus Holz,

---

[1]) Diese Zeitschr. 184, 131, 1922.
[2]) Proceedings 22, Nr. 7, 1920.
[3]) Diese Zeitschr. 144, 72, 1924.

welche einen mit Milchglas versehenen Spalt besitzt, getrennt. Das Ganze ist inwendig schwarz gestrichen und die erste Abteilung auch von oben zugedeckt. Das eine Röhrchen enthielt die erwähnte, zu titrierende Mischung, während die zweite — mit Wasser anstatt $CaCl_2$-Lösung beschickt — als Kontrollröhrchen diente. Es wird der Tyndalleffekt von obenher beobachtet und als Grenzwert diejenige Menge den Röhrchen tropfenweise zugegebene Oxalatlösung betrachtet, welche in dem $CaCl_2$-haltigen Röhrchen eine faßbare Trübung verursacht. Wir möchten noch darauf aufmerksam machen, daß die Trübung nicht sofort nach Zugabe der Oxalatlösung entsteht, und daß der ganze Vorgang auch einen Zeitfaktor besitzt, wahrscheinlich zufolge der Übersättigung der Lösung mit gelöstem Calciumoxalat (s. weiter unten). Wir haben uns deshalb bei der Ablesung der Werte immer an eine in den Tabellen näher angegebene Frist gehalten.

Wir kommen nun zur Besprechung unserer in den nachstehenden Tabellen zusammengestellten Versuchsergebnisse. Zu den Tabellen sei im allgemeinen folgendes bemerkt: Spalte 4 stellt die bis zur Trübung zugesetzte Ammoniumoxalatmenge in Kubikzentimetern dar; die Bewertung dieser Zahlen folgt aus der Theorie der Methode. Das Löslichkeitsprodukt des Calciumoxalats stellt eine konstante Größe dar: Ca . Oxalat $= k =$ 0,055 für Millimole pro Liter. Je größer die gefundene Oxalatmenge, desto kleiner die vorhandene Ca-Ionenkonzentration. Ein Ansteigen der zur Titrierung verbrauchten Oxalatmenge bedeutet somit eine geringere Ca-Ionenkonzentration.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß eine reine $CaCl_2$-Lösung mit 0,3 ccm der angewandten Oxalatlösung eine Trübung gibt. Wird nun NaCl in steigender Menge hinzugefügt, so muß dementsprechend mehr und mehr Oxalatlösung zugesetzt werden, um eine Trübung zu erreichen, d. h. durch NaCl wird die Ca-Ionisation zurückgedrängt. Dieses Ergebnis sagt noch nichts Neues aus; es folgt aus dem Massenwirkungsgesetz, da nach ihm die gemeinsamen Cl-Ionen auch die Ca-Ionisation

Tabelle I.

$CaCl_2$ (0,012 proz.) — NaCl (0,564 proz.). Ablesung innerhalb 10 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	NaCl ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,30
1,0	0,2	1,8	0,37
1,0	0,4	1,6	0,438
1,0	0,6	1,4	0,503
1,0	0,8	1,2	0,563
1,0	1,0	1,0	0,633
1,0	1,2	0,8	0,710
1,0	1,4	0,6	0,767
1,0	1,6	0,4	0,823
1,0	1,8	0,2	0,897
1,0	2,0	—	0,980

Tabelle II.

$CaCl_2$ (0,012proz.) — $NaNO_3$ (0,564proz.). Ablesung innerhalb 10 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	$NaNO_3$ ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,30
1,0	0,2	1,8	0,383
1,0	0,4	1,6	0,428
1,0	0,6	1,4	0,480
1,0	0,8	1,2	0,540
1,0	1,0	1,0	0,563
1,0	1,2	0,8	0,60
1,0	1,4	0,6	0,660
1,0	1,6	0,4	0,707
1,0	1,8	0,2	0,763
1,0	2,0	—	0,823

zurückdrängen müssen. *Brinkmann* und *van Dam*[1]) haben sogar an diesem Beispiel ihre Methode zahlenmäßig geprüft, indem sie nachweisen konnten, daß die aus dem Massenwirkungsgesetz berechnete Ca-Ionenkonzentration mit der auf diese Weise gefundenen sehr gut übereinstimmt.

Der Versuch in Tabelle II wurde nun mit einer $NaNO_3$-Lösung ausgeführt, und es war auch hier ein Anwachsen der zur Trübung erforderlichen Oxalatmengen mit steigendem $NaNO_3$-Gehalt zu verzeichnen. Die Ca-Ionisation wird demzufolge auch hier zurückgedrängt, obwohl kein gemeinsames Ion anwesend.

Tabelle III.

$CaCl_2$ (0,012proz.) — KNO_3 (n/10). Ablesung innerhalb 5 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	KNO_3 ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,23
1,0	0,2	1,8	0,27
1,0	0,4	1,6	0,323
1,0	0,6	1,4	0,363
1,0	0,8	1,2	0,437
1,0	1,0	1,0	0,477
1,0	1,2	0,8	0,517
1,0	1,4	0,6	0,567
1,0	1,6	0,4	0,597
1,0	1,8	0,2	0,650
1,0	2,0	—	0,707

Tabelle III enthält eine ähnliche Versuchsreihe mit $CaCl_2$ und KNO_3 mit demselben Ergebnis.

[1]) l. c.

Tabelle IV.

Versuch mit NaCl und $NaNO_3$-Lösungen gleicher Normalität. Ablesung innerhalb 5 Minuten.

$CaCl_2$ 0,012 proz. ccm	NaCl n/10 ccm	$NaNO_3$ n/10 ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm
1,0	—	—	2,0	0,23
1,0	1,0	—	1,0	0,48
1,0	—	1,0	1,0	0,48

Tabelle V.

Versuch mit KCl- und KNO_3-Lösungen gleicher Normalität. Ablesung innerhalb 5 Minuten.

$CaCl_2$ 0,012 proz. ccm	KCl n/10 ccm	KNO_3 n/10 ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm
1,0	1,0	—	1,0	0,475
1,0	—	1,0	1,0	0,473
1,0	—	—	2,0	0,23

Weitere Versuche (Tabelle IV und V), in welchen Salze mit gemeinsamen (Cl) und verschiedenen (NO_3) Anionen in bezug ihrer Wirkung auf die Ca-Ionisation parallel untersucht wurden, zeigen sowohl bei Anwendung der Na- als auch der K-Salze, daß die Ionisation vom Anion durchaus unabhängig ist.

Es gibt aber auch Elektrolyte, z. B. $Mg(NO_3)_2$, welche die Ca-Ionisation nicht beeinflussen können. Ebensowenig wird dieselbe durch Nichtelektrolyte, so durch Traubenzucker (Tabelle VII), Milchzucker (Tabelle VIII), Rohrzucker (Tabelle IX) verändert.

Tabelle VI.

$CaCl_2$ (0,012proz.) — $Mg(NO_3)_2$ (n/10). Ablesung innerhalb 10 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	$Mg(NO_3)_2$ ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,30
1,0	0,4	1,6	0,30
1,0	1,0	1,0	0,30
1,0	2,0	—	0,30

Tabelle VII.

$CaCl_2$ (0,012proz.) — Traubenzucker (0,564proz.). Ablesung innerhalb 10 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	Traubenzucker ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,30
1,0	2,0	—	0,30

Tabelle VIII.

$CaCl_2$ (0,012proz.) — Milchzucker (0,564proz.).
Ablesung innerhalb 2 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	Milchzucker ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,26
1,0	2,0	—	0,26

Tabelle IX.

$CaCl_2$ (0,012proz.) — Rohrzucker (0,564proz.).
Ablesung innerhalb 3 Minuten.

$CaCl_2$ ccm	Rohrzucker ccm	H_2O ccm	$(NH_4)_2C_2O_4$ ccm
1,0	—	2,0	0,26
1,0	2,0	—	0,26

All diesen Befunden kann nun die bereits erwähnte Fehlerquelle der angewandten Methode entgegengehalten werden, daß sich namentlich Übersättigungen mit löslichen Calciumoxalat bilden können, durch welche der Oxalatverbrauch größer, als dem tatsächlichen Löslichkeitsprodukt entsprechend, befunden wird. Obwohl *Brinkman* und *van Dam* solche Übersättigungen nur bei Titrierung einer reinen $CaCl_2$-Lösung vorfinden konnten, haben wir, um diese Möglichkeit gänzlich auszuschalten, einige Versuchsreihen nach dem ursprünglichen Vorschlag der genannten Autoren ausgeführt; nach diesem werden steigende abgemessene Mengen der Oxalatlösung zuerst im Wasserbad eingedampft und nachher mit der $CaCl_2$-Lösung zusammengebracht. Wir haben nun die in Tabelle X, Spalte 1 verzeichneten Mengen der Oxalatlösung (es wurde hier eine 0,0899proz. Natriumoxalatlösung verwendet) in kleine Reagenzgläser abgefüllt, im Wasserbad eingetrocknet, sodann mit 1 ccm unserer $CaCl_2$-Lösung und 2 ccm destillierten Wassers versetzt und nach Auflösung des Trockenrückstands in unserem Kästchen geprüft.

Tabelle X.

Ablesung innerhalb 3 Minuten.

$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm H_2O	$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm H_2O
0,05	—	0,25	++
0,10	—	0,30	+++
0,15	—	0,35	+++
0,20	+	0,40	+++

+ = Trübung.

Tabelle XI.

Ablesung innerhalb 3 Minuten.

$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm H_2O	$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm H_2O
0,18	—	0,24	+
0,20	—	0,26	++
0,22	+	0,28	+++

+ = Trübung.

Mit dieser Methode tritt die erste Trübung in einer $CaCl_2$-Lösung nach Tabelle X und XI bei 0,20 bzw. 0,22 ccm Oxalatlösung auf. Bei direkter Titrierung nach der *Behrendt*schen Modifikation tritt die erste Trübung bei 0,26 ccm derselben Oxalatlösung auf. Wird nun mit $CaCl_2$ gleichzeitig auch $NaNO_3$ zum Trockenrückstand der Oxalatlösung gegeben (Tabelle XII und XIII), so wird der Grenzwert der ersten Trübung weit höher, bei 0,5 ccm gefunden. Die direkte Titrierung mit den genannten Lösungen ergab 0,6 ccm Trübungsgrenzwert. Obwohl nun die direkte Titrierung — vermutlich zufolge Übersättigung — immer höhere Oxalatmengen erfordert, ist der Einfluß des Na-Salzes auch durch die originelle, *Brinkman-van Dam*sche Methode ganz deutlich nachzuweisen.

Tabelle XII.

Ablesung innerhalb 3 Minuten.

$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm $NaNO_3$ (0,564 proz.)	$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm $NaNO_3$ (0,564 proz.)
0,1	—	0,5	+
0,2	—	0,6	++
0,3	—	0,7	+++
0,4	—	0,8	+++

+ = Trübung.

Tabelle XIII.

Ablesung innerhalb 3 Minuten.

$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm $NaNO_3$ (0,564 proz.)	$Na_2C_2O_4$ 0,0899 proz. ccm	Nach Eindampfen Zugabe von 1 ccm $CaCl_2$ (0,012 proz.) + 2 ccm $NaNO_3$ (0,564 proz.)
0,44	—	0,52	++
0,46	—	0,54	++
0,48	—	0,56	+++
0,50	+	0,58	+++

+ = Trübung.

In einer $CaCl_2$-Lösung wird somit die Ca-Ionisation durch die Anwesenheit anderer (Na, K) Salze auch dann zurückgedrängt, wenn sich keine gleichartigen Anionen vorfinden.

Mit dieser Feststellung wird die weiter oben abgeleitete Forderung, daß der Ionenantagonismus in einer Zurückdrängung der Ionisation besteht, in bezug auf die Ca-Ionen bestätigt. Zum vollständigen Ausbau des Problems wird noch der Nachweis gehören, daß auch das andere antagonistische Kation (Na, K) in seiner Ionisation zurückgedrängt wird, ferner die Beantwortung der Frage, auf welche Weise diese Ionisationsverminderung zustande kommt. Wir vermuten, daß es sich hier um die Bildung komplexer, nicht dissoziabler Verbindungen handelt, ohne genaueres darüber aussprechen zu können. In der Literatur haben wir gar nichts über komplexe Verbindungen dieser Kationen oder über entsprechendes physikalisch-chemisches Verhalten binärer Salzgemische vorgefunden, so daß diese Fragen ebenfalls einer weiteren Untersuchung harren. Als Wegweiser derartiger Arbeiten kann uns folgende Vorstellung dienen: Treten zwei geeignete Kationen, z. B. Ca und Na zusammen, so entsteht eine komplexe Verbindung. Diese Verbindung enthält eine bestimmte Menge beider Kationen. Befinden sich dieselben in der Lösung in einem Verhältnis, welches der Zusammensetzung dieser komplexen Verbindung entspricht, so treten wahrscheinlich sämtliche Ionen in dieselbe ein, so daß die Lösung keine freien Ionen enthält; ist dagegen das eine oder das andere Ion im Überschuß vorhanden, so wird ein Minimumgesetz bezüglich der Komplexverbindung obwalten, und es bleibt ein Teil des betreffenden, überschüssigen Ions frei; dann ist die Lösung mehr oder weniger ionenaktiv. Es ist klar, daß je nach dem günstigeren oder ungünstigeren Verhältnis der betreffenden Ionen eine schwächere oder stärkere Ionenwirkung zu erwarten sein wird, bei welcher auch individuelle Eigenschaften der Ionen nicht außer acht gelassen werden können. Es schließt sich an diese Probleme als eine besondere Fragestellung an, ob die physiologische Äquilibrierung einen ionenfreien Zustand bedeutet oder aber einer bestimmten Ionenkonzentration gewisser Kationen und Anionen gleichkommt. Die neueren Untersuchungen über Ca-Ionenkonzentrationen der Ringerlösung und der Körpersäfte sprechen für den letzteren Fall.

Im Anschluß an unsere Erörterungen soll noch darauf hingewiesen werden, daß unsere Befunde in die ganze aktuelle Frage der Ca-Ionisation mit einbezogen werden müssen. Die Verschiedenheit der Ergebnisse, welche von den einzelnen Autoren auf Grund ihrer Berechnungen und Beobachtungen zutage gefördert werden, weist ebenfalls darauf hin, daß das Problem zurzeit durch manche klarzustellende Unkenntnisse getrübt wird.

Zusammenfassung.

Der Sitz des Ionenantagonismus ist nicht auf der Kolloidoberfläche, sondern in der Salzlösung selbst zu suchen. Der Vorgang soll sich in der Ionisation von Salzgemischen kundgeben, und es wird dementsprechend mit der *Brinkman-van Dam*schen Methode untersucht, ob die Ca-Ionisation in $CaCl_2$-Lösungen durch die Anwesenheit anderer Kationen beeinflußt wird. Es stellt sich tatsächlich heraus, daß die Ca-Ionisation durch andere (Na, K) Salze auch in dem Falle zurückgedrängt wird, wenn keine gemeinsame Anionen vorhanden sind. Dagegen beeinflussen Mg-Salze und Nichtelektrolyte (Traubenzucker, Milchzucker, Rohrzucker) die Ca-Ionisation nicht.

Somit besteht der Ionenantagonismus in einer *primären* gegenseitigen Zurückdrängung der Ionisation, und die Kolloideffekte sind nur als sekundäre Folgen derselben anzusehen.

Nachwort.

Wir hatten unseren Aufsatz der Redaktion bereits zugesandt, als uns die soeben erschienene Arbeit von *H. Schulten*[1]) bekannt wurde. Dieser Autor unterzieht die *Brinkman-van Dam*sche Methode einer scharfen Kritik und spricht ihr jede Zuverlässigkeit ab. Unsere mit dieser Methode gewonnene Beweisführung würde somit entkräftet werden. Wir können zum methodologischen Teile zurzeit keine Stellung nehmen, es bleiben aber sodann die festgestellten Tatsachen als offene Fragen übrig: Warum verhält sich eine reine $CaCl_2$-Lösung doch anders als eine solche, welche auch andere Kationen enthält? Warum verhalten sich manche Kationen (Mg) nicht in demselben Sinne? und warum werden diese Verhältnisse durch Nichtelektrolyte gar nicht beeinflußt? Um unsere theoretischen Erwägungen, welche Ableitungen aus anderen Befunden darstellen, zu unterstützen, haben wir nach der *Schulten*schen Kritik jedenfalls auch andere Wege einzuschlagen.

---

[1]) Diese Zeitschrift **164**, 47.

Konzentrierung und Reinigung von Lösungen hydrophiler Kolloide.

Von

H. Bechhold und E. Heymann.

(Aus dem Institut für Kolloidforschung, Frankfurt a. M.)

(*Eingegangen am 11. Februar 1926.*)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Reinigung kolloider Lösungen geschieht seit *Grahams* Zeiten mit Hilfe der Dialyse. Ihre Mängel: Langsamkeit der Reinigung und Verdünnung des Sols durch Dialysierwasser sind bekannt. Die Dialyse kann vorteilhaft durch die Ultrafiltration[1]) ersetzt werden, indem man das Sol einengt, hierauf mit reinem Wasser verdünnt und diese Operation mehrmals wiederholt; hierbei werden die kristalloiden Verunreinigungen ausgewaschen. Wie *E. Heymann*[2]) zeigen konnte, geht die Reinigung durch Auswaschen auf dem Ultrafilter etwa 4- bis 14mal so schnell von statten, wie durch Dialyse. Gleichzeitig kann man bei der Ultrafiltration das Sol beliebig konzentrieren.

A. Konzentrierung der Sole.

Bei Solen hydrophober Kolloide geht das Konzentrieren recht schnell vor sich, da die Durchlaufsgeschwindigkeit für Wasser bei Anwendung der *Bechhold-König*schen Ultrafiltergeräte[3]) und einer 5proz. Eisessigkollodiummembran sehr groß ist (etwa 600 ccm in der Stunde bei 100 ccm filtrierender Fläche). Aber auch die Sole vieler hydrophiler Kolloide (Albumin, Globulin, Casein) lassen sich in verhältnismäßig

---

[1]) *H. Bechhold*, Zeitschr. f. phys. Chem. **60**, 257, 1907; **64**, 328, 1908; Kolloid-Zeitschr. **1**, 107, 1906; **2**, 3, 1907.

[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. **118**, 65, 1925.

[3]) *H. Bechhold* und *L. Gutlohn*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1924, S. 494.

kurzer Zeit konzentrieren; eine etwa 2- bis 5proz. Albuminlösung läßt sich bei Anwendung von 100 ccm filtrierender Fläche und einer 7proz. Eisessigkollodiummembran in etwa 1 Stunde auf die Hälfte ihres Volumens einengen. Bei Solen von höherer Viskosität, insbesondere solchen, die bei Zimmertemperatur schon in geringer Konzentration erstarren (Gelatine), macht das Konzentrieren gewisse Schwierigkeiten; diese lassen sich aber leicht überwinden, wenn man die *Temperatur* erhöht. Eine Angabe von *Reitstötter* und *Lasch*[1]), „die praktische Unmöglichkeit, Gelatinelösungen durch Ultrafiltration zu konzentrieren, sei bekannt", ist daher *durchaus irrig*, soweit sich diese Angabe auf die *Bechhold*schen Ultrafilter bezieht.

a) Fraktionierung von Gelatinelösungen.

Die Ultrafiltration leistete sogar bei der Untersuchung des Gehalts von Leimen und Gelatinen an Glutin, Proteosen, Peptonen und Aminosäuren sehr wertvolle Dienste. Mit Glutin bezeichnet man diejenigen Bestandteile der Gelatine, die aus einer 2proz. Gelatinelösung bei Halbsättigung mit Magnesiumsulfat ausfallen; mit Proteosen diejenige Fraktion, welche erst bei Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat ausfällt; der Rest sind Peptone und Aminosäuren. Eine quantitative Bestimmung wird nach *G. Bogue*[2]) ausgeführt, indem man von einer Gelatine den Gesamtstickstoffgehalt (Mikrokjeldahl) bestimmt, sie ferner mit Magnesiumsulfat in eine Glutinfraktion (I) und eine Glutin + Proteosenfraktion (II) zerlegt und in diesen den Stickstoffgehalt bestimmt; die Differenz zwischen Fraktion II und dem Gesamtstickstoff entfällt auf die Peptone und Aminosäuren. Die Fällbarkeit dieser Proteine durch anorganische Salze erst in hoher Konzentration ließ die Vermutung aufkommen, daß diese fraktionierte Fällung mit Lösungen ein und desselben Salzes in verschiedener Konzentration mit Dispersitätsverschiedenheiten des gelösten Stoffes zusammenhänge, daß also eine Fraktionierung nach der Teilchengröße stattfindet; die Versuche *S. Odéns* an Schwefelhydrosolen[3]) sprechen für diese Vermutung. War diese Annahme richtig, so mußte es gelingen, die Gelatine durch Filtration durch Ultrafilter verschiedener Durchlässigkeit in die gleichen Fraktionen zu zerlegen, wie durch Fällen mit Magnesiumsulfat. Zu diesem Zwecke wurde z. B. eine Gelatinelösung durch Ultrafiltration bei 40 bis 60° auf die Hälfte eingeengt und sowohl im Filtrat als auch im Rückstand nach der oben beschriebenen

[1]) Diese Zeitschr. **165**, 90, 1925.
[2]) Chem. Met. Eng. **28**, 6, 1920.
[3]) Zeitschr. f. phys. Chem. **77**, 682.

Methode Glutin, Proteosen, Peptone und Aminosäuren bestimmt [Versuchsanordnung siehe Abb. 1[1])].

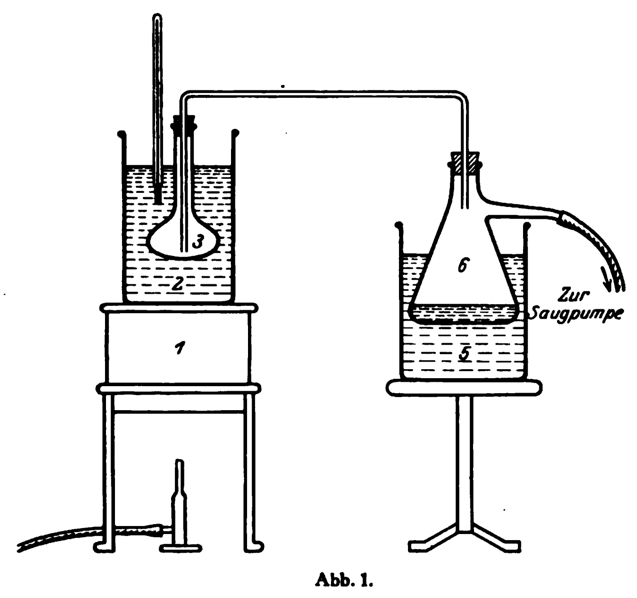


Abb. 1.

1. Wasserbad,
2. Becherglas mit Sol,
3. Ultrafilterballon, a. d. Außenseite mit Ultrafiltermembran versehen,
4. Thermometer,
5. Kühlbad,
6. Saugflasche als Vorlage.

Bei den Versuchen zeigte sich nun, daß *Glutin* im allgemeinen von einer 4proz. Membran zurückgehalten wird; bei den *Proteosen* ergaben sich gewisse Schwierigkeiten. Ein 7proz. Filter hielt bei Gelatine und bei manchen der untersuchten Leime die Proteosen zurück, bei anderen Leimen erwies es sich als für Proteosen durchlässig, bei anderen Leimen hingegen konnten die Proteosen schon durch ein 4proz. Ultrafilter (mit dem Glutin zusammen) zurückgehalten werden. Hieraus ergibt sich also, daß die Fraktion, die man mittels Salzfällung als „Proteosen" identifiziert, nicht isodispers ist, daß also *bei verschiedenen Leimen* die *Proteosen* einen *verschiedenen Dispersitätsgrad* besitzen. Bei der Untersuchung auf Peptone bei der Ultrafiltration durch 7- und 10proz. Filter ergaben sich ähnliche Verhältnisse.

Die Fraktionierung von Solen mit Hilfe der Ultrafiltration ist ein einfaches Problem bei Gemischen von großem Dispersitätsunterschied;

[1]) Die Versuche wurden von Herrn Dr. *W. Sorger* im „Institut für Kolloidforschung" ausgeführt (Dissertation Frankfurt a. M. 1925: „Die Trennung von Glutin und seinen Abbauprodukten durch Ultrafiltration und Salzfällung").

bei feineren Unterschieden in der Teilchengröße sind angesichts der Ungleichporigkeit der Membranen die Versuchsergebnisse mit einer gewissen Vorsicht auszuwerten. Jedenfalls läßt sich aus den oben angegebenen Versuchen folgern, daß die Fraktionen, in die sich das Gemisch von Glutin und Abbauprodukten einerseits durch Salzfällung, andererseits durch Ultrafiltration durch Membranen von verschiedener Durchlässigkeit zerlegen läßt, nicht vollkommen identisch sind, d. h. bei der Fällung des Glutin-Abbauproduktegemisches durch Salzlösungen verschiedener Konzentration wird nicht ausschließlich eine Trennung in Fraktionen gleichen Dispersitätsgrades bewirkt; vielleicht spielen dabei doch noch andere Einwirkungen des Metallsalzes auf das Protein eine Rolle.

b) Untersuchungen an technischen Leimen.

An dieser Stelle seien auch einige Versuche erwähnt, die Herr Dr. *S. Neumann* im „Institut für Kolloidforschung" ausgeführt hat. Es wurden mehrere Leimsorten (je 500 ccm von 5proz. Lösungen) der Ultrafiltration durch ein mit 4proz. Eisessigkollodiummembran imprägniertes *Bechhold-König*sches Ballonfilter unterworfen; die Lösung wurde auf 250 ccm eingeengt, wieder auf 500 ccm aufgefüllt und abermals auf die Hälfte eingeengt. Wir greifen willkürlich einen Versuch heraus. Bei Leim B war die Trockensubstanz im Rückstand von 5 auf 12,5 Proz. gestiegen, der Trockengehalt des Ultrafiltrats betrug 1,65 Proz. Der Aschengehalt des Leimes war durch die geschilderte Prozedur von 1,21 auf 0,66 Proz. gesunken und hätte sich bei nochmaliger Wiederholung des geschilderten Verfahrens noch sehr viel weiter vermindern lassen. Es wurden mit den so behandelten Leimen *Zerreißfestigkeitsbestimmungen* mit der Papierstreifenmethode [*Bechhold* und *Neumann*[1])] gemacht und mit den Zerreißwerten der nicht behandelten Leime verglichen. Die Zerreißfestigkeiten der Leime pro Quadratzentimeter, bezogen auf die gleiche Leimmenge waren bei dreien der verarbeiteten Leime um 12 bis 25 Proz. gestiegen und nur bei einem um 4 Proz. gesunken. Ferner wurde gezeigt, daß eine Leimlösung durch Ultrafiltration von 5 Proz. bis auf 28 Proz. Trockensubstanz konzentriert werden kann; die Trockenbestimmung im Ultra*filtrat* ergab 1,67 Proz. Weiterhin wurden bei einem größeren Versuch 4 kg einer 5proz. Leimlösung bei 60° ultrafiltriert. Die Ultrafiltration kam nach 12 bis 13 Stunden infolge Verstopfung der Poren langsam zum Stillstand. Der Rückstand wog 800 g, die Lösung war also auf etwa das Fünffache konzentriert worden.

---

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1924, Nr. 30.

B. Reinigungsmethoden für Lösungen hydrophiler Kolloide.

Bezüglich der Befreiung eines Sols von *ionisierten Kristalloiden* haben die beiden oben genannten Reinigungsmethoden (Dialyse und Ultrafiltration) durch die Elektrodialyse [*Morse* und *Pierce* und insbesondere *Pauli* u. a.[1])] und der Elektro-Ultrafiltration [*Bechhold* und *Rosenberg*[2])] eine Vervollkommnung erfahren; wegen der Versuchsanordnung muß auf die Originalarbeiten verwiesen werden. Mit Hilfe dieser Methoden gelingt es, wie *E. Heymann* (l. c.) berechnet hat, ein Sol 10- bis 100mal so schnell von Elektrolyten zu reinigen als durch reine Dialyse oder Ultrafiltration. Gegenüber der Elektrodialyse hat die Elektro-Ultrafiltration den *Nachteil*, daß man temperaturempfindliche Sole unter Umständen kühlen muß, während bei der Elektrodialyse die Kühlung durch das Spülwasser erfolgen kann; gegenüber der Elektrodialyse hat die Elektro-Ultrafiltration den *Vorteil*, daß durch sie auch die nichtionisierten Kristalloide schneller entfernt werden als durch erstere. Ferner erlaubt die Elektro-Ultrafiltration in einem Sol gleichzeitig die feiner dispersen Anteile von den gröberen zu trennen, also z. B. Albumin gleichzeitig mit der Reinigung von Elektrolyten von seinen kolloiden Abbauprodukten (Albumosen) zu befreien, was mit Hilfe der Elektrodialyse infolge der Kleinheit des Diffusionskoeffizienten dieser Stoffe nicht möglich ist. Ferner gestattet die Elektrodialyse, im Gegensatz zur Elektro-Ultrafiltration, keine Konzentrierung des Sols. Wesentlich ist weiterhin, daß bei der Elektrodialyse die angelegte *Spannung schlechter ausgenutzt* wird als bei der Elektro-Ultrafiltration, da bei der ersteren zwischen Elektrode und Membran reines Wasser zirkulieren muß; in diesen Spülwasserräumen fällt ein großer Teil der angelegten Spannung unwirksam ab[3]).

Eine gewisse Konzentrierung ihrer Lösung bei der Elektrodialyse konnten *F. Reitstötter* und *G. Lasch* (l. c.) durch eine originelle Versuchsanordnung erzielen, die anderen Nachteile bleiben auch bei ihrer Methode bestehen. Die genannten Autoren verwenden, wie bei der Elektrodialyse üblich, einen Dreizellenapparat; doch kommt nur etwa ein Sechstel des zu verarbeitenden Sols in den Mittelraum, der größte Teil befindet sich zunächst in einem (höherstehenden) Rezipienten, der mit dem Mittelraum in Verbindung steht. In dem Maße, wie das Wasser

---

[1]) Kolloid-Zeitschr. **31**, 252, 1922.

[2]) Diese Zeitschr. **157**, 85, 1925.

[3]) Die Angabe *Reitstötters* und *Laschs*, die Elektro-Ultrafiltration sei ein „Verfahren zur Konzentration von Gelatine und Leimlösungen“, erweckt falsche Vorstellungen; wie aus dem oben Gesagten und auch aus der Publikation von *Bechhold* und *Rosenberg* (l. c.) hervorgeht, ist ihre Hauptaufgabe die Reinigung des Sols; außerdem kann dabei die Lösung auch konzentriert werden.

unter der Einwirkung des elektrischen Stromes aus der Mittelzelle in den Kathodenraum auswandert, läßt man das Sol aus dem Rezipienten in den Mittelraum fließen; eine Einwanderung des Wassers aus dem Anodenraum in die Mittelzelle wird durch geeignete Membranen, z. B. chromierte Gelatine, vermieden[1]). Hierdurch wird eine Konzentrierung des Sols bewirkt.

So brauchbar diese Anordnung in vielen Fällen sein mag, so bleibt trotzdem die Überlegenheit der Elektro-Ultrafiltration auch über diese Form der Elektrodialyse aus den oben angegebenen Gründen bestehen. Bei der Elektro-Ultrafiltration wird die Konzentrierung des Sols durch eine Kombination von Ultrafiltration und Elektroosmose bewirkt, bei *Reitstötter* und *Lasch* durch Elektroosmose allein. Nach Versuchen von *Bechhold* und *Rosenberg* ist der durch Ultrafiltration (Unterdruck: 1 Atm.) bewirkte Wassertransport bei Anwendung einer 7proz. (albumindichten) Eisessigkollodiummembran etwa fünf- bis sechsmal so groß, wie der durch Elektroosmose (Spannungsgefälle etwa 50 Volt/cm) bewirkte, und es wird wohl nur selten möglich sein, durch starke Erhöhung der Elektrodenspannung und durch Wahl geeigneter Membranen den elektroosmotischen Wassertransport so zu steigern, daß er dem Ultrafiltrationseffekt, wie *Reitstötter* und *Lasch* meinen, gleichkommt oder gar diesen überflüssig macht.

Auch die Versuche von *Prausnitz*[2]) geben keinen Anhalt dafür, daß der Elektroosmoseeffekt den Ultrafiltrationseffekt überflüssig machen könnte. Der Wassertransport durch eine 7proz. eiweißdichte Bechholdmembran unter der Wirkung der Ultrafiltration beträgt etwa 400 bis 500 ccm pro Stunde bei 100 qcm filtrierender Fläche. Dieser Effekt sei verglichen mit dem Elektroosmoseeffekt an Zsigmondymembranen, die nach *Remy*[3]) von allen untersuchten Materialien die stärkste Elektroosmose zeigen. Ein Membranfilter mittlerer Dichtigkeit (vermutlich nicht eiweißdicht), das — entgegen den Forderungen der *Helmholtz*schen Theorie — in bezug auf Elektroosmose optimal ist, zeigte nach *Prausnitz* bei einem Spannungsabfall von etwa 100 Volt pro Zentimeter eine Wasserüberführung von 1 bis 2 Liter in der Stunde. Da man aber bei elektrodialytischen Arbeiten infolge des größeren Abstandes der Elektroden auch bei hoher Netzspannung wohl kaum mehr als einen Spannungsabfall von 50 Volt pro Zentimeter wird erzielen können, und da der Ultrafiltrationseffekt sowohl an der Kathoden- als auch an

[1]) Hierbei wäre allerdings zu beachten, daß die Membran aus chromierter Gelatine sich beim Gebrauch in chemischer und wohl auch in kapillarelektrischer Hinsicht verändert (vgl. *Ettisch* und *Beck*. Deutsch. med. Wochenschr. **47**, 1, 1925).

[2]) Kolloid-Zeitschr. **29**, 291, 1921.

[3]) Zeitschr. f. phys. Chem. **118**, 161, 1925.

der Anodenseite, der Elektroosmoseeffekt aber nur an der Anodenseite stattfindet, so ist selbst bei diesem für die Elektroosmose so günstigen Beispiel von einem Zurücktreten des Ultrafiltrationseffekts hinter den Elektroosmoseeffekt keine Rede. Eine Steigerung des Elektroosmoseeffekts durch Zugabe von Elektrolyten zum Sol ist bei allen Arbeiten, die auf eine Reinigung des Sols hinzielen, unzweckmäßig. Während bei der Methode von *Reitstötter* und *Lasch* die Größe des Konzentrationseffekts von der Reaktion im Sol abhängig ist, ist die Elektro-Ultrafiltration in bezug auf die Konzentrierung des Sols vom p_H der Lösung weitgehend unabhängig, da bei dieser die p_H-empfindliche Elektroosmose keine große Rolle spielt.

Gegenüber der reinen Dialyse und Ultrafiltration hat die Elektro-Ultrafiltration nicht nur den Vorteil der stark abgekürzten Versuchs*dauer*, sondern es gelingt auch, einen *höheren Reinheitsgrad* zu erzielen; so ist z. B. das durch 5- bis 6stündige Elektro-Ultrafiltration gereinigte Eieralbumin (in 5proz. Lösung) *absolut aschefrei*. Wie noch zu veröffentlichende Versuche aus unserem Institut zeigen, sind die Fällungsreaktionen des Eiweißes mit Schwermetallsalzen, insbesondere die sogenannten „unregelmäßigen Reihen“ bei einem absolut aschefreien Albumin ganz verschieden von denen, die mit einem nicht völlig gereinigten Eiweiß ausgeführt werden.

Zusammenfassung.

1. Es wurde gezeigt, daß im Gegensatz zu den Angaben von *Reitstötter* und *Lasch* eine *Konzentrierung von Gelatinelösungen* (und anderen hydrophilen Solen) mit Hilfe der Ultrafiltration nicht nur möglich, sondern auch einfach ist.

2. Eine *Fraktionierung von Gelatine- und Leimlösungen* wurde mittels Ultrafiltration durchgeführt; die erhaltenen Fraktionen sind nicht vollkommen identisch mit denen, die nach der *Bogue*schen Methode (durch fraktioniertes Fällen mit Magnesiumsulfat) erhalten werden.

3. Durch Auswaschen auf dem Ultrafilter wurden Leime von Abbauprodukten und von Asche teilweise befreit. Der Grad der Reinigung ist abhängig von der Häufigkeit des Auswaschens. Die so behandelten Leime zeigten erhöhte Festigkeitseigenschaften.

4. Die elektrischen Methoden (*Elektrodialyse* und *Elektro-Ultrafiltration*) werden diskutiert und miteinander verglichen. Es ergibt sich, daß allein die Elektro-Ultrafiltration eine Entfernung der Elektrolyte *und* nichtionisierten Kristalloide, sowie gleichzeitig eine Fraktionierung und Konzentrierung der kolloiden Lösung gestattet.

Über die Bildung von Acetaldehyd und Acetylmethylcarbinol bei der Gärung und der Atmung der Hefe.

Von

L. Elion.

(Aus dem organisch-chemischen Institut der Universität Utrecht.)

(*Eingegangen am 11. Februar 1926.*)

I.

Man nimmt jetzt allgemein mit *Neuberg* an, daß der bei der Vergärung von Zucker durch Hefe entstehende Äthylalkohol aus intermediär auftretendem Acetaldehyd gebildet wird. Bekanntlich ist man imstande, diesen Aldehyd, der unter normalen Verhältnissen quantitativ reduziert wird, während der Gärung anzuhäufen, sei es mit Hilfe eines Abfangmittels, das den Aldehyd in statu nascendi festlegt, oder durch die Einwirkung einer anderen reduzierbaren Substanz, welche ihn zum Teil als Wasserstoffakzeptor verdrängen kann. Indessen ist es auch möglich, daß ein Auftreten von Acetaldehyd als Endprodukt der alkoholischen Zuckerspaltung von einer sekundären Oxydation des Gärungsäthylalkohols herrührt, während schließlich unter bestimmten Bedingungen beide Ursachen im Spiele sein können.

Eine solche Kombination einer primären und einer sekundären Acetaldehydbildung hat man bei der alkoholischen Gärung in Gegenwart von Kohle. Vor mehreren Jahren hat *Söhngen*[1]) beobachtet, daß die Zugabe von Kohle eine bedeutende Förderung der Gärung zur Folge hat, die er der niedrigeren Kohlensäurekonzentration der Flüssigkeit zuschrieb, denn infolge eines schnellen Entweichens dieses Gases durch Bläschenbildung wird das Kulturmedium nicht mit Kohlensäure übersättigt. *Neuberg* und *Sandberg*[2]) haben bei ihren Studien über Stimulatoren der alkoholischen Zuckerspaltung gezeigt, daß verschiedene Kohlensorten imstande sind, auch die zellfreie Gärung mittels Hefesäften zu beschleunigen. Hinsichtlich der Deutung dieser Aktivierung wurde

---

[1]) *N. L. Söhngen*, Folia Microb. 2, 95, 1913.
[2]) *C. Neuberg* und *M. Sandberg*, diese Zeitschr. 126, 153, 1921.

von ihnen auch die Möglichkeit einer Bildung von Acetaldehyd mit in Betracht gezogen, dessen gärungsfördernde Wirkung sie schon früher[1]) festgestellt hatten. Auf diese Weise könnte die Leistung der Kohle in letzter Linie eine solche des Acetaldehyds sein.

Eine experimentelle Unterstützung dieser letztgenannten Annahme ergab sich nun aus den Untersuchungen von *Abderhalden* und seinen Mitarbeitern[2]), aus welchen hervorgeht, daß bei der Zuckervergärung in Anwesenheit von Kohle tatsächlich beträchtliche Mengen Acetaldehyds erzeugt werden[3]). Es gelang den genannten Autoren festzustellen, daß einerseits diese Acetaldehydbildung dadurch herbeigeführt wird, daß die Verbindung während der Gärung durch die Kohle adsorbiert und auf diese Weise einer Reduktion zum Äthylalkohol entzogen wird. Durchaus im Einklange mit den Ergebnissen der übrigen Abfangverfahren konnte in diesem Falle ebenfalls eine Zunahme der normalen Glycerinausbeute nachgewiesen werden.

Andererseits wurde jedoch gefunden, daß ein Teil des Acetaldehyds von einer sekundären Oxydation des Alkohols herrührt. Es ergab sich nämlich, daß, wenn man Äthylalkohol, Hefe und Tierkohle in wässeriger Lösung zusammengibt, nach einiger Zeit Geruch nach Acetaldehyd auftritt. Zwar zeigte es sich, daß auch bei Anwendung von Äthylalkohol ohne Hefe, mit Tierkohle Acetaldehyd erzeugt wird, aber in den Parallelversuchen mit lebenden Hefen fielen die Reaktionen auf Acetaldehyd immer bedeutend stärker aus als mit Tierkohle allein. Es unterlag keinem Zweifel, daß Äthylalkohol + Tierkohle + Hefe regelmäßig zu einer ganz beträchtlichen Acetaldehydbildung führen.

Ein zweites Beispiel einer kombinierten primären und sekundären Acetaldehydbildung bietet die alkoholische Gärung unter kräftiger Lüftung, wie dieselbe bekanntlich bei der Lufthefenfabrikation stattfindet. Bei der Anwendung dieser Methode ist nämlich der Aldehydgehalt der ausgegorenen Maischen bedeutend größer als bei der Darstellung von Hefe nach dem Wiener Verfahren. „Der Lufthefenrohspiritus ist so ziemlich der minderwertigste seiner Genossen. Durch die starke Lüftung ist er reich an Aldehyd“[4]).

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 145, 1918; *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*, ebendaselbst **101**, 239, 1920.

[2]) *E. Abderhalden*, Fermentforschung **5**, 89, 110, 255, 1921; *E. Abderhalden* und *S. Glaubach*, ebendaselbst **6**, 143, 1922; *E. Abderhalden* und *W. Stix*, ebendaselbst **6**, 345, 1922.

[3]) Es ist bemerkenswert, daß *Abderhalden*, obgleich seine Versuche mit lebenden Hefen eine ganz bedeutende Gärungsaktivierung erwiesen, konstatierte, daß die Gärung mittels Hefepreßsaft und -mazerationssaft durch Kohle gehemmt bis unterbrochen werden kann.

[4]) *W. Kiby*, Handbuch der Preßhefenfabrikation, S. 617.

Das Verständnis, daß es sich hier in erster Linie um eine „primäre" Acetaldehydbildung handelt, verdankt man *Kluyver*, *Donker* und *Visser 't Hooft*[1]), die vor kurzem dargetan haben, daß das Eingreifen des Sauerstoffs darin besteht, daß derselbe den normalerweise als Wasserstoffakzeptor auftretenden Acetaldehyd verdrängt. Dieser Vorgang muß also notwendig eine Anhäufung des bei der carboxylatischen Spaltung der Brenztraubensäure erzeugten Aldehyds herbeiführen. Wie die Autoren schließen, unterscheidet sich die Wirkung des Sauerstoffs in erster Instanz durchaus nicht von dem Einfluß, den andere geeignete Wasserstoffakzeptoren in dieser Hinsicht ausüben.

In zweiter Linie darf man, wie gesagt, den Acetaldehyd auch als ein sekundäres Oxydationsprodukt betrachten. Dies geht ohne weiteres aus den Beobachtungen von *Trillat* und *Sauton*[2]) hervor, daß bei Berührung von Äthylalkohol mit Hefe, und namentlich bei kräftiger Aeration, Acetaldehydbildung stattfindet, welche die Oxydation durch Kontakt mit porösen Substanzen bei weitem übertrifft[3]). Die erwähnten beiden Autoren haben ihre Versuche mit verschiedenen Hefevarietäten (Bäckerhefe und Bierhefe) ausgeführt und die besten Resultate mit Bäckerhefe erhalten, ein Befund, welchem im Lichte der jüngsten Erfahrungen *Meyerhofs*[4]), daß der Äthylalkohol imstande ist, die Atmung der Preßhefe, nicht aber die der Bierhefe, in hohem Maße zu steigern, neue Bedeutung zukommt[5]).

Im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen habe ich auch die von *Trillat* und *Sauton* beschriebenen Versuche unter etwas abänderten Bedingungen wiederholt, und dabei ihre Angaben über die Acetaldehydbildung auch mit der von mir benutzten Preßhefe der

---

[1]) *A. J. Kluyver*, *H. J. L. Donker* und *F. Visser 't Hooft*, diese Zeitschr. **161**, 375, 1925.

[2]) *A. Trillat*, C. r. de l'Acad. des Sciences **146**, 645, 1908; *A. Trillat* und *B. Sauton*, ebendaselbst **146**, 996, 1908; **147**, 77, 1908; Ann. de l'Inst. Pasteur **24**, 310, 1910; Bull. Soc. Chim. (4) **7**, 244, 1910.

[3]) *C. Neuberg* und *J. Kerb* (diese Zeitschr. **48**, 497, 1912; **58**, 166, 1913; **64**, 252, 1914; Ber. **47**, 2730, 1914) haben gefunden, daß eine verdünnte wässerige Lösung von Äthylalkohol mit gärfähigem Hefanol reichlich Aldehyd liefert.

[4]) *O. Meyerhof*, Naturwissenschaften **13**, 980, 1924; diese Zeitschr. **162**, 43, 1925.

[5]) *H. Lundin* (diese Zeitschr. **142**, 454, 1923), der Preßhefe mit verdünntem Alkohol im Sauerstoffstrom geschüttelt hat, berichtet nicht über eine Acetaldehydbildung. Er verweist betreffs der Reaktionsprodukte auf frühere Versuche, bei welchen statt Alkohols Zucker vorhanden war. Daß aber die Reaktion auf Acetaldehyd bei den Zuckerproben negativ ausfiel, wird vielleicht hierauf zurückzuführen sein, daß dieselbe in alkalischer Lösung vorgenommen wurde, in welcher der Aldehyd leicht Umwandlungen erfährt.

„Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek" zu Delft durchaus bestätigen können. Die Oxydation ist schon nach kurzer Zeit wahrnehmbar. So waren z. B., bei Lüftung einer anfänglich aldehydfreien Mischung von 10 g Preßhefe und 200 ccm 10proz. wässerigen Alkohollösung, nach 1 Stunde die Acetaldehydreaktionen schon ganz intensiv. Die betreffenden Versuche wurden so ausgeführt, daß ein kräftiger Luftstrom durch die Suspension und sodann durch einige mit Wasser gefüllte, eisgekühlte Waschflaschen geleitet wurde. Die Prüfung auf Acetaldehyd geschah mittels Nitroprussidnatrium-Piperidin und nach *Tollens*. Sie wurde sowohl mit der ursprünglichen, filtrierten und destillierten Flüssigkeit als mit derjenigen der Waschflaschen vorgenommen.

Anläßlich der bekannten Theorie *Warburgs*[1]) über die Rolle des Eisens als sauerstoffübertragender Bestandteil des Atmungsferments, welche Wirkung ich früher[2]) auch bei einer von bestimmten, obligat anaeroben Bakterien herbeigeführten Übertragung von Sulfatsauerstoff auf organische Substanzen beobachtet hatte, schien es mir von Bedeutung, die obengenannten Versuche auch in Gegenwart einer Eisenverbindung vorzunehmen. Dabei stellte es sich nun heraus, daß die erwähnte Acetaldehydbildung durch Zugabe einer Ferrichloridlösung sehr kräftig gefördert wird. Dies ging nicht nur aus Parallelversuchen mit und ohne Eisenchlorid hervor, sondern auch daraus, daß die Aldehydreaktionen der gelüfteten Preßhefe-Alkohol-mischung nach Beigabe von Eisenchlorid (z. B. 2,5 ccm 75proz. Ferrichlorid pro 100 ccm) bei weitem stärker ausfielen. Die Kontrollversuche ergaben, daß bei Aeration einer mit Eisenchlorid versetzten wässerigen Alkohollösung höchstens Spuren Acetaldehyd auftreten.

II.

In letzter Zeit ist wiederholt über die von *Neuberg* und Mitarbeitern entdeckte Bildung von Acetylmethylcarbinol bei der Gärung der Hefe berichtet worden, welche bekanntlich unter besonderen Umständen erzwungen werden kann. Man hat ihre Erzeugung nachgewiesen bei der Vergärung von Brenztraubensäure[3]) sowie von Oxalessigsäure[4]), und bei der Vergärung von Zucker unter Hinzufügung von Acetaldehyd[5]) oder anderen Wasserstoffakzeptoren[6]). Daraus ist zu schließen, daß die Hefe imstande ist, den auf dem Gärungswege gebildeten Acet-

---

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. 152, 479, 1924; Ber. 58, 1001, 1925.

[2]) *L. Elion*, Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 63, 62, 1924.

[3]) *J. Hirsch*, diese Zeitschr. 131, 178, 1922; *C. Neuberg* und *A. von May*, ebendaselbst 140, 299, 1923.

[4]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, Ergebn. d. Physiol. 24, 191, 1925.

[5]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. 143, 553, 1923.

[6]) *A. J. Kluyver*, *H. J. L. Donker* und *F. Visser 't Hooft*, l. c., S. 363.

aldehyd mit solchem Acetaldehyd, der aus irgend einem Grunde in Übermaß anwesend ist, zum Acetoin zu vereinigen.

Es schien mir nun erwünscht, festzustellen, wie es sich mit der Atmung der Hefe verhält, d. h., ob auch bei der ebengenannten oxydativen Bildung von Acetaldehyd aus Äthylalkohol, also ohne jede Gärung, Acetylmethylcarbinol erzeugt wird.

Meine Versuche in dieser Richtung, welche ich mehrfach wiederholte, hatten ein positives Ergebnis. Sie lehrten nämlich, daß bei kräftiger Aeration einer zuerst acetoin- und butylenglykolfreien Suspension von 10 Proz. Preßhefe in 5- bis 10proz. wässeriger Alkohollösung, nach mehreren (z. B. 10) Stunden die Anwesenheit von Acetylmethylcarbinol durch Überführung in Nickel-dimethylglyoxim[1]) nachzuweisen ist. In den zu gleicher Zeit angestellten Kontrollversuchen, welche keinen Alkohol enthielten, war die Acetoinreaktion immer negativ, was außerdem darauf hinweist, daß es sich hier nicht, oder wenigstens nicht ausschließlich, um eine etwaige Wirkung von Kohlenhydraten der Hefe handelt.

Dieser Befund ist nun zunächst interessant, weil daraus hervorzugehen scheint, daß die so merkwürdigen carboligatischen Eigenschaften der Hefe nicht immer an irgend einen Gärungsvorgang gebunden sind, sondern auch ohne denselben zutage treten können[2]).

Nebenher scheint der Schluß berechtigt, daß die zum ersten Male von *Kluyver*, *Donker* und *Visser 't Hooft*[3]) bei der Lufthefefabrikation beobachtete Acetoinsynthese, ganz abgesehen von der stattfindenden Gärung, auch lediglich infolge der oxydativen Acetaldehydbildung auftreten kann.

Man könnte schließlich die Frage stellen, ob für die Aneinanderreihung der Aldehydmoleküle immer ein Teil derselben in statu nascendi vorhanden sein muß, wie dies sowohl bei der auf dem Gärungswege, als jetzt auch auf dem Atmungswege beobachteten Acyloinbildung der Fall ist. Dies ist allem Anschein nach jedoch nicht notwendig. Es zeigte sich nämlich außerdem, daß auch eine 3proz. wässerige Acetaldehydlösung, nach Zugabe von 10 Proz. Preßhefe, schon im Verlauf von z. B. 3 Stunden, im Gegensatz zu den Parallelversuchen ohne Aldehyd, eine kräftige Acetylmethylcarbinolreaktion lieferte.

---

[1]) *M. Lemoigne*, Ann. de l'Inst. Pasteur 27, 856, 1913; C. r. de l'Acad. des Sciences 170, 131, 1920; *A. J. Kluyver*, *H. J. L. Donker* und *F. Visser 't Hooft*, l. c., S. 364.

[2]) Eine andere Erklärung wäre es, daß das Acetylmethylcarbinol auch bei den genannten Versuchen wieder aus Zucker stammt, weil doch die Hefe imstande sein soll, aus Äthylalkohol wieder Zucker zurückzubilden. Mir kommt aber eine solche, etwas gezwungene Vorstellung, auch auf Grund der nachfolgenden Beobachtung weniger wahrscheinlich vor.

[3]) *A. J. Kluyver*, *H. J. L. Donker* und *F. Visser 't Hooft*, l. c., S. 376.

Wirkung von Arzneimitteln und Strahlen auf Hefe.

I. Mitteilung:

Versuche über die Grundlage des Arndt-Schulzschen Gesetzes.

Von

Heinrich Zeller.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Königsberg.)

(Eingegangen am 15. Februar 1926.)

Hugo Schulz hat bekanntlich Versuche angestellt, die sich mit der Wirkung verschiedener Gifte auf die Gärtätigkeit der Hefe beschäftigen. Er fand, daß schwache Dosen Gifte die Tätigkeit anfachen, mittlere sie fördern und starke sie hemmen oder vernichten. *Schulz* glaubte damit die experimentelle Grundlage für das von *Arndt* entdeckte, später *Arndt-Schulz*sche Gesetz genannte Verhalten beigebracht zu haben.

Ich halte es für notwendig, zunächst die Technik genau zu schildern, nach der *Schulz* verfahren hat.

Eine 10 proz. Traubenzuckerlösung wurde mit Giften verschiedener Konzentration versetzt. Diese Mischungen wurden in Gärgefäße gebracht und am anderen Tage dazu gleiche Teile Hefebrei gegeben. Ein solches Gärgefäß bestand in einem mittels Deckel verschließbaren Zylinder; darin stand ein kleinerer zweiter Zylinder, der mit Quecksilber gefüllt war und dessen oberer Rand die Gärflüssigkeit überragte. In das Quecksilber tauchte ein Steigrohr, das durch den Deckel des Gärungsgefäßes luftdicht nach oben geführt war und frei endigte. Entwickelte nun die Hefe Kohlensäure, so mußte sie das Quecksilber in dem Steigrohr in die Höhe treiben. Die Höhe der Quecksilbersäule konnte erst abgelesen werden, sobald sie über das Niveau des Deckels hinausgestiegen war.

Die Versuchsanordnung läßt folgende Einwände zu:

1. konnte die Hefe nicht durch Schütteln in der Versuchsflüssigkeit gleichmäßig verteilt werden,

2. stand die Gärflüssigkeit unter dem Druck der Quecksilbersäule,

3. wurde der sich bildende Alkohol nicht entfernt. Dieser letztere Einwand ist bedeutungslos, weil im Rahmen des Versuchs nicht derartig große Mengen gebildet werden, daß sie die Gärtätigkeit hemmen würden. Endlich läßt sich noch der Einwand erheben, daß es fraglich ist, ob ein zu gleichen Teilen abgemessener Hefebrei auch wirklich genau gleiche Mengen Hefezellen enthält.

Es ist deswegen nicht verwunderlich, wenn *Schulz* keine miteinander vergleichbaren Resultate erhielt. Schon in einem Leerversuch ohne Giftzusatz differieren die Druckwerte bei gleichen Zeiten erheblich untereinander, wie folgende Zahlen ergeben. Die sechs Leerversuche zeigten nach $4\frac{1}{2}$ Stunden folgende Werte als Differenz des Anfangs- und Enddruckes in Millimeter Quecksilber bei $\frac{1}{4}$stündiger Ablesung:

10,50,	7,95,	9,75,	11,90,	13,85,	10,45
0,25,	0,20,	0,10,	0,20,	0,40,	0,40
0,55,	0,35,	0,80,	0,70,	0,90,	0,40

wobei die zweite Reihe mehr aus dem Anfang des Versuchs, die dritte mehr aus dem Ende genommen wurde. Die Zahlen, die einen Unterschied von höchstens 10 Proz. zeigen sollten, zeigen Unterschiede bis 100 Proz.

Ich verfuhr bei meinen Versuchen anders: Es kommt nicht darauf an, wieviel Kohlensäure absolut entsteht, sondern auf die verschiedenen Mengen, die die einzelnen Gärflaschen in der Zeiteinheit gleichzeitig bilden. Die in der Gärflüssigkeit entstehende Kohlensäure wird unter konzentrierter Kochsalzlösung in einem graduierten Zylinder von 100 ccm aufgefangen. Der umgestülpte Zylinder wird von Zeit zu Zeit nach Füllung durch Kohlensäure entleert und von neuem mit Kochsalzlösung gefüllt. Wasser wurde nicht benutzt, um einen Verlust an Kohlensäure durch Absorption zu vermeiden. Am Fuße des Zylinders befand sich eine Drahtöse zum Aufhängen und Wenden, durch den Zylinder ging eine Glasröhre, die mit dem einen Ende dessen Boden berührte, mit dem anderen Ende durch einen Gummischlauch mit dem Gärgefäß verbunden war. Gleichzeitig wurde mit sieben Gärflaschen gearbeitet, die nebeneinander im Wasserbad standen, vor ihnen waren die sieben Zylinder in einer Kochsalzlösung aufgehängt. Um die Ablesungsresultate direkt verwenden zu können, wurde ein Inhalt des Steigrohres von 4 ccm gewählt. Abgelesen konnte infolgedessen erst werden, wenn diese 4 ccm aus dem Steigrohr verdrängt waren. Dann

wirkt aber der negative Druck der Kochsalzsäule im Zylinder auf die im Gärungsgefäß eingeschlossene Gasmenge, deren Volumen 200 ccm betrug, und dehnt sie um 4 ccm aus, so daß sich der Verlust ausgleicht. Hat die Kohlensäure die Flüssigkeit im Zylinder bis zur Marke 100, die auf der Höhe des Spiegels der Außenflüssigkeit sich befindet, verdrängt, so ist der Druck innen und außen gleich, es findet keine Ausdehnung des Gases mehr statt, aber auch der Lumeninhalt des Steigrohres wird voll mit abgelesen. Ist dagegen die Kohlensäureentwicklung nur bis Marke 50 vorgedrungen, so wird die Saugwirkung auf die Hälfte reduziert sein, aber das Gasvolumen ist von 200 auf 250 ccm gestiegen. Dieses Gas wird durch den negativen Druck auf 252,5 ccm ausgedehnt; man erhält also 2,5 ccm zuviel; das im Steigrohr befindliche Gas wird aber schon zur Hälfte mit abgelesen, so daß der wirkliche Fehler nur $\frac{1}{2}$ ccm beträgt. Es wurden meist Gärflaschen von 1000 ccm Inhalt benutzt, sie wurden dann mit 800 ccm gefüllt, um einen Luftraum von 200 ccm zu haben. Bei Versuchen mit 1000 ccm Gärflüssigkeit blieben noch 25 ccm toter Raum, dann wurde ein Steigrohr mit einem Lumen von 1 ccm gewählt, und es war möglich, damit ebenfalls direkte Ablesungen zu machen.

Der eigentliche Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt: Zum Leerversuch wurden 125 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser von 30° genommen, die Hefe ganz fein mit der Hand in der Lösung zerrieben, häufig umgerührt, so daß keine fühlbaren Teilchen mehr vorhanden waren. Nach 2 Stunden waren alle Hefezellen einzeln bis auf wenige Häufchen zu ungefähr zehn Zellen. Inzwischen hatte sich die Flüssigkeit bis auf 22 bis 25° abgekühlt. Nach längerem Umrühren wurde sie zu gleichen Teilen auf die sieben Flaschen verteilt. Die Flüssigkeitsmengen der zugefügten Giftlösungen waren meist zu vernachlässigen; waren sie aber größer, so wurden sie gleich groß genommen, und eine entsprechende Menge Gärflüssigkeit weniger genommen. Zur Kontrolle wurde selbstverständlich die entsprechende Wassermenge ohne Gift gegeben. Nach Zusatz der Gifte wurde einige Male leicht umgeschüttelt, auch die Kontrolle, da durch das Umschütteln stets Kohlensäure abgegeben wurde. Dann wurden sie ins Wasserbad von bestimmter Temperatur gestellt. Um Ungleichmäßigkeiten zu vermeiden, wurde einige Zeit mit der Ablesung gewartet. Dann wurden die Zylinder der Reihe nach im Abstand von 10 Sekunden gefüllt und wieder aufgehängt. Es mußten im gleichen Abstand die Ablesungen vorgenommen werden, d. h. jeder Zylinder 10 Sekunden später. Der Ausgangspunkt für die Ablesung war der Zeitpunkt, in dem bei der Kontrolle die Kohlensäure die Marke 90 erreicht hatte. Ein Auszug aus dem Leerversuch gibt folgende Resultate:

Zeit	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flasche 4	Flasche 5	Flasche 6	Flasche 7
12h 18 bis 27′	90	91	88	88	86	88	90
12 37′	90	88	88	88	90	90	90
12 47	90	90	86	88	86	90	90
12 57	90	89	88	88	92	88	87
1 06	90	91	88	88	92	88	87
1 15	90	92	87	89	92	88	87
1 50 bis 58	90	92	91	91	90	88	90
2 07	90	90	90	90	90	88	90
2 16	90	91	89	90	90	90	90
2 25	90	91	90	90	91	90	91

Der weitere Verlauf des Versuchs zeigt keine größeren Differenzen als die beiden letzten Reihen aufweisen. Der Leerversuch ergibt also gleichmäßige Resultate im Gegensatz zu dem von *Schulz*. Die erste senkrechte Spalte bedeutet die Zeit, die gebraucht wird, um 90 ccm Kohlensäure zu erzeugen. Die Doppelzahlen stehen bei Beginn oder Wiederaufnahme der Ablesung. Sie weisen scheinbar eine Minute Zeit weniger zur Erzeugung von 90 ccm Kohlensäure auf als die fortlaufend abgelesenen; diese Minute geht bei der Ablesung bzw. Wiederfüllung der Flaschen zu Verlust, sie muß von den fortlaufend abgelesenen Zeiten in Abzug gebracht werden.

Durch diese Versuchsanordnung wurde nun tatsächlich erreicht, daß bei Leerversuchen mehrere Flaschen stets in gleichen Zeiten gleiche Mengen Kohlensäure lieferten. Die äußerste Fehlergrenze betrug bei dem im Gange befindlichen Versuch zwischen den einzelnen Kontrollflaschen $\pm$ 2 Proz. Je nach der gewählten Menge Hefe und der Temperatur wurden in den Leerversuchen 90 ccm Kohlensäure in 4 bis 24 Minuten erzeugt. Die Versuche dauerten den Tag über, doch wurden die Ablesungen, wenn der Versuch längere Zeit im Gange war, stundenlang ausgesetzt. Bei diesem Leerversuch werden zu Beginn 90 ccm Kohlensäure in etwa 9 Minuten erzeugt, später in 8, eine Geschwindigkeit, die die Hefe einige Stunden beibehielt, um dann am Schlusse des Versuchs für die Erzeugung derselben Menge eine längere Zeit zu brauchen.

Die Hefe wurde von einer Stelle täglich frisch bezogen, sie stammte aus der Tilsiter Preßhefefabrik. Wohl habe ich Unterschiede in der Leistung der Hefen gefunden, doch in den hier angeführten Versuchen zeigen sie alle das gleiche Verhalten. Zu den Versuchen wurde Leitungswasser benutzt, da eine Schädigung durch destilliertes Wasser sich feststellen ließ, die besonders beim Zusatz der Gifte zum Vorschein kam. Bei den vielen ausgeführten Versuchen kam als Zucker nur Rübenzucker in Betracht. Ein Wachstum der Hefezellen war beim Auszählen vor und nach dem Versuch kaum festzustellen. Es scheint

bei dieser Versuchsanordnung sich um eine reine Gärwirkung zu handeln. Daher wurden auch Stoffe, die eine Vermehrung begünstigen, wie Phosphorsäure und Ammoniak, vom Versuch ausgeschlossen. Die Vorbereitungen wurden stets mit den am Tage vorher benutzten Gefäßen ausgeführt, die nur diesem Zwecke dienten. Die Hefe hatte immer eine gute Triebkraft, schon 1 Stunde nach Beginn des Ansetzens war sie auf voller Höhe ihrer Leistung und behielt sie einige Stunden bei.

Die nun folgenden Giftversuche verliefen alle in gleicher Weise, wie die Tabellen zeigen, und es war möglich, die gefundenen Werte eines Versuchs mit denen eines anderen zu vergleichen.

Versuch mit Sublimat.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser werden nach 1½stündiger Gärung auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,8 mg Sublimat; Flasche 3 1,6 mg; Flasche 4 3,2 mg; Flasche 5 6,4 mg; Flasche 6 9,6 mg; Flasche 7 16,0 mg Sublimat. Temperatur des Wasserbades 20 bis 22°.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,002 Prom.	0,004 Prom.	0,008 Prom.	0,012 Prom.	0.02 Prom.
2h 30 bis 52′	7	0	0	0	0	0	0
2 57′	9	0	0	0	0	0	0
3 08	12	8	0	0	0	0	0
3 35	24	20	8	16	15	8	4
3 57	90	97	83	85	52	52	33
4 20	90	99	90	85	75	65	45
4 41	90	96	90	84	80	70	60
5 01	90	96	94	84	82	74	65
5 34 bis 52	90	98	94	85	80	75	68
6 14	90	95	90	85	80	75	68
6 34	90	91	86	85	80	76	66
6 54	90	90	86	84	82	80	66
7 34 bis 54	90	93	87	90	90	86	72
8 10 „ 30	90	91	88	94	95	90	80
9 30 „ 50	90	88	87	92	95	92	86
10 11	90	88	89	95	95	93	92
10 32	90	90	88	90	96	95	97
10 56	90	90	88	90	95	96	88
11 20 bis 45	90	90	88	88	91	90	92

Der Versuch mit Sublimat wurde absichtlich bei niederer Temperatur (22°) vorgenommen, um die Kohlensäureentwicklung möglichst langsam vor sich gehen zu lassen, weil es wichtig war, die Leistung im Anfang des Versuchs genau beobachten zu können. So sehen wir denn, daß in diesem Versuch die Erzeugung von 90 ccm Kohlensäure durch die Gärung beinahe 90 Minuten in Anspruch nahm. Wir können daher sehen, wie die Kontrolle zuerst zu arbeiten beginnt, dann beginnen die mit Sublimat versetzten Flaschen, und zwar in Höhe und Beginn ihrer Leistung ungefähr in umgekehrtem Verhältnis zu der Konzentration des Giftes. Nach einiger Zeit

erholen sich alle und erreichen nicht nur die Höhe der Kontrollzahlen, sie gehen sogar noch darüber hinaus, und zwar zuerst die geringste und erst am Schluß die stärkeren Konzentrationen; später sinken sie alle langsam wieder zur Norm zurück. Flasche 0,001 Prom. erreicht mit 10 Proz. gegenüber der Kontrolle die höchste Mehrleistung, aber nur auf kurze Zeit. Zieht man aber den Durchschnitt durch die Gesamtmehrleistung, so beträgt er im Höchstfalle nur 2,7 Proz. mehr gegenüber der Kontrolle. Die anderen weisen ähnliche Verhältnisse auf, wenn der Vorsprung mit Beginn der Erreichung der Normalen gerechnet wird. Wird aber von Beginn des Zusatzes an gerechnet, so bleiben alle trotz der späteren Steigerung im Vergleich zur anfänglichen Hemmung gegen die Norm zurück. Im Höchstfalle werden 60 ccm Kohlensäure bei Zusatz von Sublimat mehr gebildet, wenn von der vorausgehenden Hemmung abgesehen wird. Es ist also möglich, daß Sublimat scheinbar bei bestimmten Konzentrationen vorübergehend eine Steigerung bewirkt, die aber ohne Effekt auf die Gesamtleistung ist.

Versuch mit Kupfersulfat.

100 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser werden nach 1½stündiger Gärung auf sieben Flaschen gefüllt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,8 mg Kupfersulfat; Flasche 3 1,6 mg; Flasche 4 3,2 mg; Flasche 5 6,4 mg; Flasche 6 9,6 mg; Flasche 7 16,0 mg Kupfersulfat. Temperatur des Wasserbades 20 bis 22°.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,002 Prom.	0,004 Prom.	0,008 Prom.	0,012 Prom.	0,02 Prom.
2h 30 bis 52′	0	0	0	0	0	0	0
3 08′	10	0	6	0	0	0	0
3 25	26	5	22	15	20	23	20
3 57	90	70	62	53	60	58	55
4 20	90	105	100	95	90	90	88
4 41	90	115	105	95	92	90	90
5 01	90	96	92	89	90	87	80
5 34 bis 54	90	96	92	88	86	86	80
6 14	90	95	94	88	88	86	82
6 34	90	91	91	86	88	82	77
6 54	90	90	90	88	87	85	82
7 34 bis 54	90	92	90	90	90	87	79
8 10 „ 30	90	91	90	89	88	86	80
9 30 „ 50	90	92	92	90	89	87	82
10 11	90	93	91	89	90	88	83
·10 32	90	90	90	91	88	86	85
10 32	90	90	90	91	88	86	85
10 56	90	93	90	92	88	89	88
10 20 bis 45	90	90	90	89	89	87	88

Das Kupfersulfat zeigt ähnliches Verhalten wie das Sublimat, nur ist die Hemmung bei den geringeren Konzentrationen eine größere, dafür ist auch der spätere Anstieg ein höherer. Die einmalige Mehrleistung geht bis 27 Proz. bei der stärksten Verdünnung, der Durchschnitt der Mehrleistung vom Überschreiten der Norm an gerechnet beträgt 4,9 Proz. Wird aber der Verlust während der Hemmung mitgerechnet, so ergibt sich nur

ein Überschuß von 2,5 Proz., genau wie beim Sublimat. Die nächsten Konzentrationen ergeben ebenfalls Steigerungen, aber keine so hohe, ebenfalls dauert die Hemmung länger an. Schon eine Verdünnung von 1 : 1 000 000 kann also eine Steigerung verursachen, die einige Zeit anhält und ungefähr eine Mehrleistung von 80 ccm ergibt. Es ist noch auf die bei den stärkeren Konzentrationen eintretenden Schädigungen aufmerksam zu machen, Flasche 0,004 Prom. läßt die Leistungen nach einigen Stunden zurückgehen, kehrt aber gegen Schluß zur Norm zurück.

Versuch mit Acid. arsen.

100 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 ccm Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen und auf sieben Flaschen gefüllt. 200 mg Arsen werden mit 200 ccm Wasser auf 100 ccm eingekocht, von dieser Lösung kommen: zu Flasche 1 0 ccm; zu Flasche 2 ½ ccm = 1 mg; zu Flasche 3 1½ ccm = 3 mg; zu Flasche 4 3 ccm = 6 mg; zu Flasche 5 6 ccm = 12 mg; zu Flasche 6 12½ ccm = 25 mg; zu Flasche 7 25 ccm = 50 mg Arsenik. Temperatur 25 bis 30°.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,003 Prom.	0,006 Prom.	0,012 Prom.	0,025 Prom.	0,05 Prom.
3h50′ bis 4h02′	90	88	99	84	72	61	35
4 15	90	92	100	88	80	63	39
4 28	90	92	98	86	80	63	39
4 41	90	100	98	90	83	62	4[illegible]
4 53	90	97	95	88	83	60	42
5 05	90	98	97	88	83	62	45
5 17	90	92	92	88	80	62	42
5 30	90	92	92	87	80	62	42
5 54	90	97	93	85	78	65	45
6 07	90	96	93	87	76	61	42
6 20	90	95	92	85	77	64	45
6 33	90	94	92	85	77	60	46
6 46	90	91	87	81	75	60	45
7 40 bis 53′	90	90	90	80	75	60	45
8 35 „ 48	90	90	89	82	74	61	45
am anderen Tage:							
8 10 bis 38	90	88	88	90	85	64	50
9 10	90	86	90	90	84	65	50
9 50	90	87	89	90	85	64	50

Schulz gibt an, daß das Optimum der Arsenikwirkung bei 1 : 40 000 liegt. Bei allen meinen Versuchen wird die Hefe bei einer Konzentration von 1 : 80 000 schon geschädigt. Nur bei einer Konzentration von 1 : 1 000 000 bis 300 000 wird durch Arsenik eine kurzdauernde Steigerung erreicht mit einem Optimum von 11 Proz. Die Ablesung dieses Versuchs wurde nicht von Anfang an gemacht, doch weisen andere Versuche stets zu Beginn Hemmung durch Arsenik auf. Die Erholung beginnt mit der kleinsten Konzentration. Beim Durchrechnen der vollständigen Versuche ergibt sich, daß der Verlust durch Hemmung durch spätere Steigerung nicht ausgeglichen wird. Ohne Zurechnung der Hemmung entsteht ein Überschuß von ungefähr 60 ccm Kohlensäure.

Versuch mit Phosphor.

100 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen. Dann in sieben Flaschen verteilt. Von einer 2prom. spirituösen Lösung erhält Flasche 1 0 ccm; Flasche 2 1 ccm = 2 mg; Flasche 3 2 ccm = 4 mg; Flasche 4 3 ccm = 6 mg; Flasche 5 4 ccm = 8 mg; Flasche 6 5 ccm = 10 mg; Flasche 7 6 ccm = 12 mg. Ferner erhält jede Flasche die zu 6 ccm fehlende Spiritusmenge. Temperatur des Wasserbades 25 bis 28°. 200 mg Phosphor werden in 100 g Spirit. absol. gelöst.

Zeit	Kontrolle	0,002 Prom.	0,004 Prom.	0,006 Prom.	0,008 Prom.	0,010 Prom.	0,012 Prom.
12h 24 bis 38′	86	89	90	100	86	74	41
12 52′	84	84	91	104	97	80	57
1 06	83	85	92	100	98	90	65
1 36 bis 46	85	92	96	97	100	95	83
1 57	85	92	96	97	100	95	82
2 08	85	92	96	97	96	93	82
2 19	85	91	96	97	96	92	85
2 30	85	90	97	98	96	92	85
3 49 bis 4h	88	92	100	99	102	96	89
3 13	85	89	95	95	96	95	87
3 26	90	95	99	99	102	96	92
3 39	85	90	95	96	100	94	88
5 11 bis 25′	90	94	100	101	102	98	92
5 39	86	92	97	97	100	95	90
5 53	85	90	95	97	99	93	86
6 07	85	89	94	96	97	92	86
8 00 bis 17	90	92	98	100	100	97	92
8 36	90	95	97	100	101	96	92
am anderen Tage:							
	100	98	98	98	97	94	100

Beim Phosphorversuch geschah die Ablesung zwischen Marke 85 und 90 der Kontrolle. Zuerst tritt Hemmung auf, was aber hier nicht verzeichnet ist. Es ist beim Versuch zu berücksichtigen, daß die Konzentrationswerte ziemlich nahe beieinander liegen, da es nicht möglich war, größere Mengen von Phosphor zuzusetzen, ohne die Hefe durch den Alkohol zu schädigen. Trotzdem tritt bei der letzten Reihe längere Zeit Hemmung auf. Die mittleren Reihen zeigen ungefähr gleiches Verhalten. Sie halten sehr lange in ihrer Steigerung an und erreichen ein Optimum von 20 Proz. Der Phosphor weicht deutlich in seinem Verhalten von den anderen Giften ab. Er zeigt eine spezifischen Wirkung. Am Schluß war noch Phosphor zu riechen. Er erzeugt ungefähr einen Überschuß von 300 ccm Kohlensäure.

Versuch mit Jodtinktur.

125 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser gären 2 Stunden, werden dann in sieben Flaschen gefüllt und ins Wasserbad bei 22° gestellt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 1 mg Jod; Flasche 3 4 mg; Flasche 4 8 mg; Flasche 5 16 mg; Flasche 6 24 mg; Flasche 7 40 mg in Form von 10proz. Jodtinktur. Alle Flaschen werden auf den gleichen Spiritusgehalt gebracht.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,004 Prom.	0,008 Prom.	0,016 Prom.	0,024 Prom.	0,04 Prom.
11h57' bis 12h03'	10	10	10	16	16	8	0
12 05	20	23	26	26	15	4	4
12 07	40	41	34	42	35	25	4
12 10	50	57	54	62	55	42	16
12 17	30	38	40	42	40	32	4
12 22	60	68	68	70	66	55	32
12 25	90	88	92	95	90	70	45
12 41	90	90	90	90	90	74	55
12 55	90	90	90	88	88	76	62
1 10	90	90	86	85	86	76	66
1 38 bis 51'	90	90	91	89	90	80	76
2 05	90	90	91	89	90	82	78
2 19	90	90	89	88	90	82	79
2 33	90	90	89	87	91	84	80
3 30 bis 45	90	90	90	86	87	86	84

Im Versuch mit Jod werden zu Anfang Zwischenwerte abgelesen, um die rasch verlaufende Jodwirkung besser zu übersehen. Jod bedingt in niederen Konzentrationen eine sofortige Steigerung, die aber schnell wirkungslos wird (Glykogenreaktion, Oxydation ?), schon nach einer halben Stunde des richtig im Gange befindlichen Versuchs sind sämtliche Werte auf 90, abgesehen von den beiden letzten. Von da ab verlaufen die ersten fünf Kolonnen ganz gleich, die beiden letzten überschreiten erst nach einiger Zeit die Norm, aber nicht über 8 Proz. Jod verursacht in kleinen Dosen eine sofortige Steigerung, die ebenso schnell wieder vergeht, nur die stärker vergifteten zeigen nach starker Hemmung eine länger andauernde Steigerung; dabei verschwindet die Jodfärbung.

Versuch mit Methylviolett.

125 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser gären 2 Stunden, werden dann in sieben Flaschen gefüllt und ins Wasserbad bei 22° gestellt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält von einer konzentrierten Methylviolettlösung 0,05 ccm; Flasche 3 0,2 ccm; Flasche 4 0,5 ccm; Flasche 5 1,0 ccm; Flasche 6 2 ccm; Flasche 7 5 ccm.

Zeit	Kontrolle	0,05 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm
11h57' bis 12h03'	10	10	20	20	12	10	0
12 05	20	10	20	20	25	20	0
12 07	40	25	25	35	40	28	4
12 10	51	45	40	60	65	50	6
12 17	30	45	45	45	42	32	6
12 22	60	70	70	71	76	57	14

Versuch mit Methylviolett (Fortsetzung).

Zeit	Kontrolle	0,05 ccm	0,2 ccm	0,5 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	5,0 ccm
12h25′	90	90	96	99	92	72	25
12 41	91	98	100	96	88	62	25
12 55	90	92	98	90	78	80	22
1 10	90	90	98	96	74	38	14
1 38 bis 51′	90	90	95	88	75	34	14
2 05	90	90	95	86	75	33	13
2 19	90	90	95	87	76	33	13
2 33	91	90	94	88	77	32	10
3 30 bis 45	90	90	92	91	80	25	8

Methylviolett steigert wie Jod sofort bei nicht zu starken Dosen, doch beginnt die richtige Steigerung später, erreicht ein Optimum von 10 Proz., fällt schnell wieder ab, nur eine Konzentration hält einige Zeit eine vermehrte Kohlensäureproduktion bei. Die stärkeren Konzentrationen lassen bald eine eigentliche Giftwirkung hervortreten, nach anfänglicher Erholung geht die Leistung wieder zurück. Die Farbe der Lösung verändert sich nicht, die Hefezellen färben sich etwas. Methylviolett steht zu Beginn in seiner Wirkung dem Jod nahe, später wirkt es ähnlich wie Kupfersulfat. Die Mehrleistung ist eine sehr kleine, beträgt ohne Zurechnung der Hemmung ungefähr 80 ccm Kohlensäure.

Versuch mit Kochsalz.

100 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 ccm Wasser werden wie sonst behandelt; dazu Kochsalz zu Flasche 1 0 g; zu Flasche 2 2,5 g; zu Flasche 3 5,0 g; zu Flasche 4 7,5 g; zu Flasche 5 10,0 g; zu Flasche 6 15,0 g; zu Flasche 7 20,0 g. Temperatur 26 bis 30°.

Zeit	Kontrolle	0,25 Proz.	0,5 Proz.	0,75 Proz.	1 Proz.	1,5 Proz.	2,0 Proz.
12h48′ bis 1h06′	90	58	49	35	31	21	18
1 04	90	71	67	49	38	14	8
2 07 bis 15′	90	95	97	98	85	89	88
2 23	90	97	102	97	88	85	85
2 33	90	100	100	94	93	87	90
2 42	90	102	102	97	97	88	87
2 52	90	105	101	95	95	85	84
3 02	90	104	100	96	96	83	82
3 12	90	100	96	94	95	84	83
3 22	90	102	99	96	95	85	83
3 32	90	102	99	98	90	87	80
3 42	90	101	96	96	87	84	80
3 53	90	101	99	99	95	84	80
4 04	90	101	97	97	95	85	78
4 15	90	102	98	102	100	88	75
4 26	90	100	95	93	98	83	77
4 37	90	101	94	94	96	85	75
4 48	90	99	93	92	94	87	72
5 33 bis 45	90	99	93	92	88	90	76
5 57	90	96	88	90	87	89	75
6 09	90	95	88	90	85	85	74
6 58 bis 7h 10′	90	96	90	93	92	90	80

Der Zusatz des Kochsalzes erfolgte 1 Stunde vor Ablesung der hier aufgezeichneten Resultate. Alle Flaschen wurden gehemmt und erholten sich nur langsam der Reihe nach, wie der Beginn der Kolonnen zeigt. Die Kontrolle erzeugt in der Zeit der Hemmung gegen Flasche 0,25 Proz. 300 ccm Kohlensäure mehr.

Diese Zahl läßt sich nicht genau bestimmen, da beim Zusatz des Kochsalzes und Mischen eine größere Menge verloren geht. Diesen Verlust holt die Flasche 0,25 Proz. gerade auf im Laufe des Versuchs, so daß die vorübergehende Steigerung von 300 ccm nur scheinbar ist. Die übrigen Flaschen weisen höhere Grade von Hemmungen auf, so daß sie diesen Verlust durch spätere Mehrarbeit nicht mehr einholen. Alle erreichen nach längerer oder kürzerer Zeit die Norm, doch sinken die beiden letzten bald zurück, um später wieder etwas zu steigen. Die anderen gehen über die Norm, das Optimum erreicht Flasche 0,25 Proz. mit 16 Proz., Flasche 1 Proz. kommt noch bis 10 Proz. Sie bleiben längere Zeit über der Norm, wie sie auch längere Zeit gehemmt waren. Kleinere Konzentrationen als 0,25 Proz. bedingen noch Steigerung bis 8 Proz., aber nur bis zu einer Konzentration bis 0,05 Proz. Die Hefe ist bei einer Konzentration bis 10 Proz. noch gärungsfähig, bei 20 Proz. wird sie abgetötet.

Es ist beim Kochsalz möglich, mit geeigneten Konzentrationen eine längere Zeit anhaltende Steigerung hervorzurufen, die aber die vorher eintretende Hemmung nicht übersteigt.

Versuch mit Jodkali.

125 g Hefe, 250 g Zucker, 5600 g Wasser werden der Gärung überlassen und dann in sieben Flaschen gefüllt. Wasserbad 25°. Flasche 1 bleibt Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,8 mg Jodkali; Flasche 3 8 mg; Flasche 4 50 mg; Flasche 5 200 mg; Flasche 6 400 mg; Flasche 7 800 mg. Temperatur 26°.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,01 Prom.	0,06 Prom.	0,25 Prom.	0,5 Prom.	1 Prom.
1h55' bis 2h09'	90	85	79	80	80	77	70
2 35 „ 47'	90	87	94	100	90	78	71
2 59	90	86	94	110	93	80	78
3 10	90	84	90	110	95	80	78
3 21	90	85	92	105	91	82	72
3 32	90	85	93	108	91	82	76
4 13 bis 21	90	87	89	105	91	85	81
4 30	90	90	97	105	92	84	85
4 39	90	89	94	105	103	90	91
4 48	90	91	93	105	103	96	93
4 57	90	93	93	104	103	100	91
5 06	90	90	96	105	100	92	92
5 15	90	92	100	106	100	98	91
6 25 bis 33	90	94	100	100	102	90	95
6 42	90	90	98	96	96	88	91
6 51	90	90	96	96	98	90	90
7 36 bis 44	90	88	90	94	96	83	88
7 52	90	89	89	96	93	86	87
am anderen Morgen:							
	16	17	27	66	26	16	25

Jodkali übt eine ähnliche Wirkung wie das Kochsalz aus. Zu Beginn eine längere Hemmung, dann Ansteigen der mittleren Flaschen über

die Norm, längeres Verweilen auf Marke 100 mit langsamem Absinken zur Norm. Eine spezifische Wirkung läßt sich nicht nachweisen, nur fängt die Wirkung schon bei kleineren Konzentrationen an und erreicht keine so hohe mögliche Konzentration wie das Kochsalz. Die Mehrausscheidung von Kohlensäure nach Überwindung der Hemmung beträgt ungefähr 300 ccm.

Versuch mit Magnesiumsulfat.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 2 g; Flasche 3 4 g; Flasche 4 10 g; Flasche 5 20 g; Flasche 6 40 g; Flasche 7 100 g Magnesiumsulfat. Temperatur 30°.

Zeit	Kontrolle	0,2 Proz.	0,4 Proz.	1,0 Proz.	2 Proz.	4 Proz.	10 Proz.
12h25 bis 28′	24	22	19	19	7	4	2
12 32′ „ 43	90	90	87	73	67	49	34
12 53	90	92	89	80	76	72	55
1 04	90	90	93	86	86	76	80
1 14	90	90	96	93	98	89	90
1 30 bis 40	90	89	93	94	96	92	90
1 51	90	89	95	93	97	95	100
2 02	90	91	95	94	95	96	97
2 14	90	91	95	95	94	94	85
2 26	90	90	94	94	95	95	88
2 38	90	90	94	92	94	93	90
2 51	90	90	95	92	93	93	91
3 03	90	90	95	94	92	92	90
4 30 bis 42	90	90	95	94	90	92	91
4 53	90	89	93	92	90	93	88
6 12 bis 25	90	89	91	92	91	92	90
6 39	90	89	91	90	90	92	92

Magnesiumsulfat wie auch Kaliumchlorid wurden genommen, um noch einmal die Salzwirkung zu prüfen. Magnesiumsulfat ist in 0,2 proz. Lösung noch unwirksam. Die nächsten Konzentrationen zeigen zu Beginn alle Hemmung. Sie erholen sich und gehen alle über die Norm. Flasche 10 Proz. erreicht mit 11 Proz. Überschuß das Optimum, aber nur vorübergehend. Am längsten arbeiten über die Norm Konzentrationen mit Flaschen 0,4 bis 2 Proz. Sonst ist der Verlauf wie beim Kochsalz.

Versuch mit Kaliumchlorid.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 2 g; Flasche 3 4 g; Flasche 4 10 g; Flasche 5 20 g; Flasche 6 40 g; Flasche 7 100 g Kaliumchlorid. Temperatur 30°.

Zeit	Kontrolle	0,2 Proz.	0,4 Proz.	1,0 Proz.	2,0 Proz.	4 Proz.	10 Proz.
12h25 bis 28′	10	7	4	2	4	3	4
12 32 „ 43	90	67	60	40	40	12	0
12 53′	90	70	70	58	55	29	10
1 04	90	88	92	84	80	55	8
1 14	90	89	90	89	79	77	10

Versuch mit Kaliumchlorid (Fortsetzung).

Zeit	Kontrolle	0,2 Proz.	0,4 Proz.	1,0 Proz.	2,0 Proz.	4 Proz.	10 Proz.
1 30 bis 40	90	90	95	93	82	82	44
1 51	90	93	95	93	85	86	60
2 02	90	93	95	94	86	82	72
2 14	90	93	95	94	86	82	80
2 26	90	92	98	95	86	82	80
2 38	90	97	98	93	86	82	82
2 51	90	96	100	95	85	82	82
3 03	90	96	100	95	85	82	82
4 30 bis 42	90	97	100	94	88	85	86
4 53	90	95	98	95	90	87	88
6 12 bis 25	90	94	98	95	91	90	88
6 39	90	93	95	93	90	92	89

Beim Kaliumchlorid wirkt schon die 2proz. Lösung schädigend. Die Hemmung zu Beginn dauert länger an. Aber alle erholen sich und die niederen Konzentrationen überschreiten die Norm, Konzentration 0,4 Proz. um 11 Proz. Sie bleiben längere Zeit darüber. Bei der dritten Kolonne ist eine sichere Gesamtmehrleistung über die Norm festzustellen unter Hinzurechnung der Hemmung von ungefähr 50 ccm Kohlensäure, ohne Zurechnung der Hemmung von 90 ccm.

Versuch mit Kaliumdichromat.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden der Gärung überlassen. Nach 2 Stunden werden sie auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle, Flasche 2 erhält 6 mg, Flasche 3 20 mg, Flasche 4 60 mg, Flasche 5 200 mg, Flasche 6 1000 mg, Flasche 7 5000 mg Kaliumdichromat. Temperatur des Wasserbades 25°.

Zeit	Kontrolle	0,006 Prom.	0,02 Prom.	0,06 Prom.	0,02 Prom.	1,0 Prom.	5,0 Prom.
11h00 bis 11′	54	45	35	28	50	21	6
11 20′	90	96	82	75	102	16	12
11 36	90	100	104	95	100	66	25
11 50	90	98	105	96	98	59	25
12 04	90	96	100	103	90	59	28
12 17	90	96	100	92	90	46	25
12 30	90	95	98	88	90	44	25
12 43	90	90	96	85	86	43	18
12 55	90	90	96	85	86	38	20
1 07	90	90	90	83	66	33	16
1 32 bis 42	90	90	90	83	57	20	15
1 54	90	90	89	78	54	20	12
2 05	90	90	90	76	54	19	8

Schulz hat zu seinen Versuchen reine Chromsäure verwandt, sie gibt aber sehr wechselnde Resultate, so daß Kaliumdichromat genommen werden mußte. Zu Beginn wirkt das Salz hemmend, dann arbeitet sich eigenartigerweise Flasche 0,2 Proz. am schnellsten herauf, fällt aber rasch zurück, um am Schluß bis auf 54 zu sinken. Ein ähnliches Verhalten zeigen die beiden letzten Flaschen: nach anfänglicher Erholung sinken die weiteren Werte fortgesetzt. Sogar die Konzentration 0,006 Proz. sinkt von 103 allmählich bis auf 76. Flasche 0,02 Proz. entwickelt ein Optimum von 17 Proz. Wird der Gesamtüberschuß zusammengerechnet, so ergibt sich ein Mehr von 70 ccm Kohlensäure in bezug auf die Norm. Die eintretende Verminderung im Laufe des Versuchs ist sicher auf eine Zellvergiftung zurückzuführen.

Versuch mit Eisenchlorid.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen und auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,6 mg, Flasche 3 2,0 mg, Flasche 4 6,0 mg, Flasche 5 20 mg, Flasche 6 100 mg, Flasche 7 500 mg Eisenchlorid. Temperatur des Wasserbades 25°.

Zeit	Kontrolle	0,0006 Prom	0,002 Prom.	0,006 Prom	0,02 Prom.	0,1 Prom.	0,5 Prom.
11h00 bis 11′	55	47	48	52	20	0	0
11 20′	90	98	98	104	58	0	0
11 36	90	102	102	100	82	6	0
11 50	90	100	96	97	86	4	1
12 04	90	100	94	95	86	7	0
12 17	90	96	90	94	85	16	0
12 30	90	96	90	92	85	27	3
12 43	90	92	90	92	86	27	0
12 55	90	92	92	90	84	27	0
1 07	90	92	89	92	83	41	4
1 32 bis 42	90	89	90	91	86	46	4
1 54	90	90	89	90	82	46	4
2 05	90	90	89	90	84	50	3

Eisenchlorid steigert in schwachen Konzentrationen sofort nach ganz kurzer Hemmung, wobei Flasche 0,006 Prom. ein Optimum von 15 Proz. erreicht, auch die Konzentrationen 0,0006 und 0,002 Prom. kommen über die 100, doch sinken sie wieder rasch ab. Sie leisten dabei einen Überschuß von 50 ccm Kohlensäure. Die Konzentration 0,02 Prom. kommt nicht mehr ganz zur Norm, und nur nach 3 Stunden erreicht Flasche 0,1 Prom. die 50. Die höchste Dosis wirkt letal. Eisenchlorid wirkt schon in Dosen von 1 : 1600000 steigernd, erzeugt aber nur einen mäßigen Überschuß an Kohlensäure.

Versuch mit Bariumchlorid.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, dann in sieben Flaschen gefüllt, ins Wasserbad bei 27° gestellt. Flasche 1 ist Kontrolle; Flasche 2 erhält 2,7 mg, Flasche 3 8 mg, Flasche 4 24 mg, Flasche 5 80 mg, Flasche 6 240 mg, Flasche 7 800 mg Bariumchlorid.

Zeit	Kontrolle	0,003 Prom.	0,01 Prom	0,03 Prom.	0,1 Prom.	0,3 Prom.	1 Prom.
5h15 bis 18′	8	4	4	2	3	0	0
5 23′	30	24	22	20	0	0	0
5 27	50	45	45	40	20	12	10
5 30	63	60	58	53	42	19	18
5 34	90	87	85	82	70	48	48
5 45	90	89	90	87	81	70	62
5 57	90	88	93	94	93	84	83
6 09	90	90	92	91	88	83	85
6 20	90	90	92	91	88	86	86
6 32	90	90	90	90	88	80	90
6 45 bis 57	90	88	90	88	85	86	85
8 10	90	89	91	89	87	89	89
am anderen Tage:							
	52	44	50	52	40	41	46
	102	84	96	104	80	88	100

Bariumchlorid hemmt zuerst, doch nach kurzer Zeit erholen sich alle, aber nur bei Zeitpunkt 5,57 übersteigen einige Flaschen die Norm, im Optimum um 4 Proz. Die Tabelle zeigt aber, daß eine Steigerung im eigentlichen Sinne nicht vorhanden ist. Es ergibt sich ein maximaler Überschuß von 8 ccm Kohlensäure.

Versuch mit Kaliumpermanganat.

65 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, in sieben Flaschen gefüllt und ins Wasserbad bei 30° gestellt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,6 mg, Flasche 3 3,0 mg, Flasche 4 10 mg, Flasche 5 30 mg, Flasche 6 100 mg, Flasche 7 500 mg Kaliumpermanganat.

Zeit	Kontrolle	0,0006 Prom.	0,003 Prom.	0,01 Prom.	0,03 Prom.	0,1 Prom.	0,5 Prom.
8h00 bis 04′	18	8	4	4	3	3	2
8 06′	36	8	6	8	8	4	2
8 10	55	18	20	28	26	28	4
8 17	90	40	46	66	72	76	0
8 31	90	80	90	100	90	66	10
8 45	90	90	96	102	86	58	4
8 59	90	95	100	100	90	60	0
9 13	90	96	98	93	87	58	0
9 27	90	95	98	92	85	56	0
9 41	90	98	98	90	80	53	0
am anderen Tage:							
	80	75	72	77	62	70	0
	80	78	75	80	70	80	0

Zu Beginn hemmt das Kaliumpermanganat. Die stärkste hier gebrauchte Dosis wirkt letal. Von den übrigen Konzentrationen erholen sich merkwürdigerweise zuerst die höheren Konzentrationen, die aber bald einen Rückgang aufweisen, der mit 80 und 53 merklich unter die Norm sinkt. Flasche 0,01 Prom. erlangt ein Optimum von 13 Proz., die ersten drei

Flaschen gehen über die Norm, sinken aber bald wieder ab. Eine nennenswerte Mehrleistung wird dabei nicht vollbracht. Die Gärflüssigkeit entfärbt sich nach kurzer Zeit. Es wird ein maximaler Kohlensäureüberschuß von etwa 80 ccm gebildet.

Versuch mit Kalium chloricum.

70 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, dann in sieben Flaschen gefüllt und ins Wasserbad bei 27° gestellt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 2,7 mg, Flasche 3 8 mg, Flasche 4 24 mg, Flasche 5 80 mg, Flasche 6 240 mg, Flasche 7 800 mg Kaliumchlorat.

Zeit	Kontrolle	0,003 Prom.	0,01 Prom.	0,03 Prom.	0,1 Prom.	0,3 Prom.	1,0 Prom.
5h 15 bis 18′	15	8	5	5	4	3	3
5 23′	33	25	20	8	6	10	10
5 27	50	39	34	31	27	20	12
5 30	70	60	52	50	46	37	30
5 34	90	79	70	68	65	53	44
5 45	90	91	86	90	90	80	70
5 57	90	94	92	93	94	90	82
6 09	90	95	94	96	98	95	90
6 20	90	95	94	96	98	95	90
6 32	90	94	94	96	98	97	95
6 45 bis 57	90	95	92	92	95	92	92
8 10	90	92	89	93	93	92	92
am anderen Tage:							
	52	50	52	50	36	38	38
	102	98	92	104	100	76	80

Kalium chloricum wurde gewählt, um festzustellen, ob es eine besondere Giftigkeit auf die Hefe ausübt. Aber nach anfänglicher Hemmung erholen sich alle Flaschen, ohne eine besondere Wirkung zu zeigen. Sie überschreiten nur für kurze Zeit die Norm, erreichen ein Optimum von 9 Proz. und gehen dann zur Norm zurück. Es ergibt sich ein maximaler Überschuß von 70 ccm Kohlensäure.

Versuch mit salicylsaurem Natron.

65 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, in sieben Flaschen abgefüllt und ins Wasserbad bei 30° gestellt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 6 mg, Flasche 3 40 mg, Flasche 4 100 mg, Flasche 5 300 mg, Flasche 6 1,0 g, Flasche 7 5,0 g Natr. salicyl.

Zeit	Kontrolle	0,006 Prom.	0,04 Prom.	0,1 Prom.	0,3 Prom.	1,0 Prom.	5,0 Prom.
8h 00 bis 04′	30	19	7	6	14	4	0
8 06′	42	45	18	18	20	5	0
8 10	60	40	38	35	32	5	0
8 17	90	71	68	60	51	18	4
8 31	90	98	96	105	66	8	4
8 45	90	98	96	104	76	8	4
8 59	90	100	100	106	76	8	0
9 13	90	100	102	107	76	8	4
9 27	90	98	99	105	75	8	4
9 41	90	100	98	108	78	8	0
am anderen Tage:							
	75	76	75	88	80	5	0
	75	80	78	90	80	7	0

Das salicylsaure Natron hemmt anfänglich, bei den beiden letzten Konzentrationen ist die Wirkung eine letale. Die ersten drei Flaschen erholen sich ziemlich rasch und übersteigen die Norm. Flasche 0,1 Proz. erreicht mit 20 Proz. das Optimum. Alle drei arbeiten fortgesetzt mit einer Steigerung von 10 bis 15 Proz., sogar die Nacht über. Es ist hier eine fortdauernde Steigerung festzustellen, die bei den anderen Untersuchungen sich bisher nicht zeigte. Der maximale Kohlensäureüberschuß beträgt 16 Proz. der Kontrolle. Die Salicylsäure weist ein derartiges Verhalten nicht auf, sie erzeugt nur eine rasch vorübergehende Steigerung.

Versuch mit Röntgenbestrahlung.

100 g Hefe, 250 g Zucker, 7000 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann in sieben Flaschen verteilt und zur Bestrahlung gebracht, die mit einem Symmetrieapparat geschieht. Der Abstand beträgt 23 cm vom Fokus der Coolidgeröhre. Bestrahlt wird ohne Filter bei 2,5 Milliamp., 110 Spannungshärtemesser, 153,75 Kilovolt und 0,08 Å.-E. — Flasche 1 bleibt unbestrahlt, Flasche 2 wird 2 Minuten, Flasche 3 5 Minuten, Flasche 4 10 Minuten, Flasche 5 20 Minuten, Flasche 6 30 Minuten, Flasche 7 40 Minuten bestrahlt.

Zeit	Kontrolle	2 Min.	5 Min.	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.
11h32 bis 40'	90	100	100	104	103	87	40
11 48'	90	97	93	100	95	85	60
11 56	90	98	96	103	101	92	70
12 04	90	98	102	100	100	94	75
12 12	90	100	98	98	100	98	82
12 20	90	100	99	100	98	97	85
12 28	90	100	105	106	97	93	85
12 36	90	100	99	99	98	101	88
12 50 bis 57	90	86	97	93	90	87	94
1 05	90	95	94	98	93	90	93
1 13	90	93	93	94	90	90	94
2 00 bis 07	90	95	96	97	95	96	94
2 14	90	95	93	95	94	90	100
2 21	90	92	94	96	94	93	106
2 28	90	90	91	92	89	88	96
2 35	90	91	92	87	84	84	92
2 42	90	91	91	86	83	82	90
4 04 bis 12	90	92	90	92	93	94	90
4 20	90	93	91	92	93	89	88
4 28	90	90	91	89	89	90	90
6 20 bis 30	90	89	90	93	96	93	89
6 41	90	94	90	92	90	90	87
8 00 bis 12	90	89	89	92	91	94	92
8 25	90	89	90	90	90	92	90

Dieser Versuch zeigt eine deutliche Wirkung der Röntgenstrahlen. Flasche 7 ist zu Beginn ziemlich gehemmt, die Flaschen 2 bis 5 haben sich schon erholt oder erholen sich noch wie Flasche 6. Alle überschreiten die Norm, das Optimum erreicht die 10 Minuten bestrahlte Flasche mit 17 Proz. Sie gehen dann langsam zu 90 zurück. Auffallend sind die plötzlichen

Sprünge der Zahlenwerte, die ein ungleiches Arbeiten der Hefezelle verraten. Von 100 geht es auf 86, von 93 auf 101; bei allen anderen Versuchen, ausgenommen denen mit Röntgenstrahlen, zeigte sich kein solches Verhalten. so daß anzunehmen ist, daß hier eine besondere Wirkung vorliegt. Die Hemmung zu Beginn ist nur bei den letzten Flaschen sichtbar, der Grund liegt in der zurückliegenden Bestrahlung, die mit der Flasche 2 begonnen wurde und mit der siebten aufhörte. In dieser Zwischenzeit haben sich die ersten schon erholt. Zur genauen Feststellung wurde während der Bestrahlung die Kohlensäureentwicklung verfolgt. Zwei vor Wärmestrahlung geschützte Flaschen wurden ins Röntgenzimmer gebracht, die eine wurde bestrahlt, die andere diente als Kontrolle. Schon nach 5 Minuten Bestrahlungsdauer konnte eine Verringerung der Kohlensäurebildung festgestellt werden.

Versuch mit Höhensonnenbestrahlung.

Je 15 g Hefe werden mit 50 ccm 5proz. Zuckerlösung in flacher Schale von 30 cm Durchmesser zu einem Brei zerrührt, so daß die Schichtdicke höchstens 1 mm beträgt Im Abstand von 50 cm werden die Schalen nach 1 Stunde mit einer Hanauer Quarzlampe bestrahlt. Eine Schale bleibt unbestrahlt, die zweite wird 5 Minuten, die dritte 10 Minuten, die vierte 20 Minuten, die fünfte 30 Minuten, die sechste 40 Minuten, die siebte 60 Minuten bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden die Schalen mit der nötigen Zuckermenge in die Versuchsflaschen ausgespült, so daß 15 g Hefe, 50 g Zucker, 1000 g Wasser auf jede Flasche kommen.

Zeit	Kontrolle	5 Min.	10 Min.	20 Min	30 Min.	40 Min.	60 Min.
5h03 bis 08'	90	102	95	96	96	90	84
5 13'	90	97	92	95	90	86	84
5 18	90	100	100	95	91	89	89
5 24	90	95	98	91	86	84	85
5 30	90	97	96	90	85	84	85
5 35	90	95	95	90	86	83	85
5 40	90	96	96	93	87	84	90
6 00 bis 05	90	96	95	90	85	83	85
6 10	90	96	95	90	85	83	85
6 15	90	96	95	93	86	80	80
6 35 bis 40	90	96	95	92	82	80	82
6 45	90	93	91	91	82	80	82
8 02 bis 07	90	90	90	97	85	83	82
8 13	90	91	91	90	86	85	85
am anderen Morgen:							
	70	70	68	70	64	61	63

Die Bestrahlung gibt ein ähnliches Resultat wie die Gifte. Die sicher am Anfang auch hier eintretende Hemmung läßt sich technich unmöglich nachweisen. Steigerung tritt bei den kürzer bestrahlten auf, geht aber nachher zurück. Bei den länger bestrahlten ist eine kleine Schädigung bemerkbar, die eigenartigerweise später zunimmt.

Bei der Durchsicht der bisherigen Versuche ergibt sich, daß alle Stoffe zu Beginn des Versuchs auf die in Gärung befindliche Hefe hemmend wirken. Nach verschieden langer Zeit erholt sich die Hefe meist bis zur alten Höhe ihrer Tätigkeit, bei bestimmten Konzentrationen kann sie sogar eine Steigerung zeigen, die aber schließlich wieder zur Norm zurückgeht. Ausnahmen machen Jod, Bariumchlorid und das salicylsaure Natron. Letzteres liefert nach anfänglicher Hemmung bei bestimmten Konzentrationen dauernd einen größeren Überschuß von Kohlensäure, der nur nach starker Reduktion des Zuckers der Gärungsflüssigkeit zurückgeht, aber bei Zusatz neuen Zuckers die alte Höhe wieder erreicht. Jod weist eine sofortige einmalige Steigerung auf, bleibt aber dann unwirksam, genau wie das Bariumchlorid, das nur Hemmung, aber keine Steigerung zeigt. Außer den hier angeführten Substanzen wurden noch viele andere untersucht, die alle ein ähnliches Verhalten aufweisen, besonders möchte ich hier die Ameisensäure und Salicylsäure erwähnen, die beide nach vorangehender Hemmung nur eine kurzdauernde Beschleunigung erzeugen, also gänzlich von der Wirkung ihrer Salze abweichen.

Bei der Durchsicht der Literatur fand ich: *Euler* und *Cassel* haben wie *Schulz* bemerkt, daß verschiedene Substanzen einen Einfluß auf die Gärtätigkeit ausüben können. Sie haben salicylsaures Natron, Phenol, Borsäure untersucht, finden aber im Höchstfall eine Steigerung von 20 Proz. Sie finden die Wirkung von Ammoniumformiat in bezug auf die Steigerung optimal. Doch lassen sich die verschiedenen Konzentrationen der Versuche schwer miteinander vergleichen, da sie nicht gleichzeitig ausgeführt wurden. Als Grund vermutet *Euler*, daß durch die Giftwirkung eine Veränderung der äußeren Zellschichten stattfindet. Warum aber die eine Konzentration steigernd wirkt, die andere schädigend, oder warum ein Stoff fortdauernd steigernd wirkt, läßt er dahingestellt.

Neuberg, *Oppenheimer*, *Fränkel*, *Abderhalden* haben gefunden, daß noch viele andere organische Säuren und Aldehyde, außerdem Vitamine und pflanzliche und tierische Extrakte steigernde Eigenschaften auf die Gärtätigkeit der Hefe besitzen. Sie werden Aktivatoren, Stimulatoren genannt und unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit. Die einen beschleunigen dauernd, die anderen nur für kurze Zeit. *Neuberg* fand, daß der Stimulationseffekt mancher Acceleratoren auf die Hefegärung, auch mit lebenden Hefezellen den Effekt einer Temperaturerhöhung ersetzt. Er stellte auch fest, daß die Entfaltung des Stimulationseffekts in einer sehr variablen Konzentrationsbreite geschieht, bis zur tausendfachen Verdünnung in manchen Fällen.

Joachimoglu ist der einzige, der *Schulzes* Versuche, nachdem schon *Euler* auf die Notwendigkeit dazu hingewiesen hatte, nachprüfte. Er

verwandte eine andere Methode zur Bestimmung der Kohlensäure. Er ließ die bei der Gärung entstehende Kohlensäure durch ein Ventil entweichen und bestimmte durch Wägung den Verlust, was nur im Intervall von Stunden geschah. Er untersuchte die Wirkung von Sublimat, Phenol und Chinin. Er stellte dabei nie eine Steigerung fest, obgleich er dieselben Konzentrationen wie *Schulz* verwandte, aber auch dieselbe Art des Hefezusatzes, er benutzte eine 50proz. Hefeaufschwemmung, die er mit der Pipette abmaß. Das Endresultat wird bei mehr oder weniger Hefe dasselbe, aber die Zwischenwerte zeigen Abweichungen, was auch seine Kontrollversuche aufweisen: Beim ersten Versuch 10 Proz., beim zweiten 30 Proz. Unterschied.

Über die Wirkung der Röntgenstrahlen hat soeben *Schneider* berichtet, ebenfalls *Klövekorn*. Eine sichere Wirkung auf Hefe ist bisher nicht nachgewiesen. Der einzige Versuch, der hier mitgeteilt wurde, sollte zeigen, daß eine Wirkung doch vorhanden ist; ausführlich werden die Ergebnisse später besprochen.

Süpfle hat Versuche mit ähnlichen Substanzen, aber statt bei Hefe an Bakterien gemacht; er hat dabei den Einfluß auf das Wachstum geprüft, während hier ein einzelner Vorgang untersucht wird.

Versuche mit kleinsten Dosen auf die Empfindlichkeit des Protoplasmas gehören hierher. *Krawkow* glaubt von manchen Giften Wirksamkeit noch in Dosen von 10^{-32} nachgewiesen zu haben. Ebenfalls hat *Kolisko* an Pflanzenkeimlingen mit Kupfersulfat, Eisensulfat, Antimontrioxydlösungen Versuche gemacht und kommt zu dem Ergebnis, daß diese Substanzen noch in Dosen von 10^{-29} wirksam seien. Meine Versuche an Hefe mit Lösungen, die weiter als 10^{-7} verdünnt waren, hatten auf den Gärungsprozeß keine Einwirkung.

Die Untersuchungen der oben genannten Forscher ergeben in bezug auf die Wirkung der von *Schulz* angewandten Gifte keine Klarheit, auch über die Art und Weise des Zustandekommens einer möglichen Steigerung gibt es keine Erklärung. Bei meinen Versuchen fand ich, daß die Steigerung bei gleichen Versuchsmengen nicht immer dieselben Resultate ergibt, sondern daß sie Schwankungen zeigt, die abhängig sind von der Temperatur und der Art der vorausgehenden Behandlung der Hefe; je höher die Temperatur über 30° war, je kürzer die Hefe vor Einbringen der Gifte gärte, um so geringer war die Steigerung. Diese Beobachtung führte zu einer systematischen Untersuchung bei höherer Temperatur. Die beiden Versuche mit Sublimat und Kupfersulfat sind als Beispiele gewählt und zeigen, daß bei dieser Temperatur keine Steigerung auftritt. Alle anderen, nur vorübergehende Steigerung verursachenden Substanzen ergaben das gleiche Resultat.

Versuch mit Sublimat bei 34°.

100 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser werden auf sieben Flaschen verteilt, nach vorheriger 1½stündiger Gärung. Flasche 1 ist Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,8 mg, Flasche 3 1,6 mg, Flasche 4 3,2 mg, Flasche 5 6,2 mg, Flasche 6 9,6 mg, Flasche 7 16,0 mg Sublimat.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,002 Prom.	0,004 Prom.	0,008 Prom.	0,012 Prom.	0,02 Prom.
10h29 bis 32′	16	0	0	0	0	0	0
10 35′	32	0	0	0	0	0	0
10 38	50	0	0	8	0	0	0
10 45	90	23	18	21	13	7	0
10 52	50	25	20	25	10	10	4
10 57	90	51	43	47	25	15	8
11 08	90	73	66	67	50	36	13
11 19	90	85	76	81	65	42	14
11 30	90	90	83	85	76	46	16
11 39	90	87	85	85	80	52	15
11 49	90	92	87	85	80	55	22
11 59	90	92	86	87	82	58	24
12 45 bis 54	90	89	85	84	84	78	40
1 04	90	88	87	85	86	81	42
1 35 bis 44	90	87	86	87	89	90	50
1 54	90	90	87	90	88	92	51
2 04	90	89	88	89	90	90	51
2 14	90	90	89	90	89	88	53
2 24	90	89	90	90	88	88	58

Der Versuch mit Sublimat bei höherer Temperatur zeigt einen ganz anderen Verlauf als bei niederer Temperatur (siehe dort). Da bei dem einen die Kohlensäureentwicklung viel langsamer verläuft als bei dem anderen, kann die Zeit nicht als Maßstab herangezogen werden, sondern nur die entwickelte Kohlensäure. Die Versuche wurden mit derselben Hefe unter den genau gleichen Umständen bis auf die Temperatur angestellt. Nach Entwicklung der ersten 90 ccm Kohlensäure hat die Flasche 0,001 Prom. bei 22° 97 ccm, bei 34° nur 23 ccm, bei 180 ccm hat dieselbe Konzentration bei 22° 196 ccm, bei 34° 74 ccm erzeugt, bei 450 ccm sind die betreffenden Zahlen 486 und 326 ccm. Hier erst fängt die Flasche 0,001 Prom. bei 34° an, so viel Kubikzentimeter wie die Normalflasche zu erzeugen. Die nächsten Kolonnen geben ähnliche Resultate. Am auffallendsten sind die Zahlen der letzten Kolonne. Dort erholt sich bei 34° die Hefe sehr langsam und kommt nur auf etwas mehr als die Hälfte der Kohlensäureentwicklung der entsprechenden Kolonne bei 22°.

Es ist zu sagen, daß bei dieser Temperatur keine Steigerung über die Norm vorkommt, und daß die Giftwirkung eine viel stärkere ist, als es die langsame Erholung zeigt.

Versuch mit Kupfersulfat bei 34°.

100 g Hefe, 350 g Zucker, 5600 g Wasser werden nach 1½stündiger Gärung in sieben Flaschen gefüllt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,8 mg, Flasche 3 1,6 mg, Flasche 4 3,2 mg, Flasche 5 6,4 mg, Flasche 6 9,6 mg, Flasche 7 16,0 mg Kupfersulfat.

Zeit	Kontrolle	0,001 Prom.	0,002 Prom.	0,004 Prom.	0,008 Prom.	0,012 Prom.	0,02 Prom.
10h29 bis 32′	16	0	0	0	0	0	0
10 35′	32	0	0	0	0	0	0
10 38	50	0	10	0	0	0	0
10 45	90	8	30	28	0	4	4
10 52	50	10	26	26	18	12	6
10 57	90	32	55	58	32	34	14
11 08	90	58	78	78	54	56	27
11 19	90	68	80	82	62	70	42
11 30	90	78	84	84	72	74	52
11 40	90	82	88	85	75	76	62
11 50	90	82	88	86	75	76	62
12 00	90	85	88	85	77	75	62
12 45 bis 54	90	85	88	85	82	76	66
1 04	90	84	87	86	84	80	68
1 35 bis 44	90	88	90	87	83	85	80
1 54	90	88	92	88	86	85	83
2 04	90	88	89	90	87	86	84
2 14	90	89	88	90	89	87	86
2 24	90	87	88	87	88	87	88

Kupfersulfat zeigt bei 34° dieselbe Wirkung wie Sublimat. Sämtliche Verdünnungen bleiben ohne Steigerung über die Norm. Die größere Giftwirkung der letzten Kolonnen bei 34° im Vergleich mit dem Kupfersulfat bei 22° ist ebenfalls vorhanden, wenn auch nicht so stark. Vergleicht man hier die 90 ccm der Norm mit der erzeugten Kohlensäure der Konzentration 0,001 Prom., so ergibt sich, daß den ersten 90 ccm bei 22° 70 ccm, bei 34° 8 ccm entsprechen; den ersten 180 ccm entsprechen 175 bzw. 40 ccm; den ersten 270 ccm: 290 bzw. 98 ccm. Nach sehr langer Zeit erreicht das Kupfersulfat bei 34° die Norm. Die nächsten Kolonnen verhalten sich in gleicher Weise. Es fällt auf, daß das Kupfersulfat bei den niederen Konzentrationen schon giftig wirkt, während bei den stärkeren die Wirkung relativ abnimmt. Also auch hier wird bei höherer Temperatur keine Steigerung erzeugt und die hemmende Wirkung nimmt zu.

Versuch mit Natrium formicicum bei 25 bis 30°.

65 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 10 mg, Flasche 3 40 mg, Flasche 4 200 mg, Flasche 5 800 mg, Flasche 6 2,0 g, Flasche 7 5,0 g Natrium formicicum. Die Temperatur wird langsam von 25 auf 30° gebracht.

Zeit	Kontrolle	0,01 Prom.	0,04 Prom.	0,2 Prom.	0,8 Prom.	2,0 Prom.	5,0 Prom.
11h48′ bis 12h07′	90	85	90	96	86	84	72
12 24	90	87	92	100	98	106	112
12 37	90	85	96	102	102	120	125
12 50	90	89	90	102	104	120	125
2 03 bis 15′	90	87	93	104	111	125	140

Versuche mit Natrium formicicum bei 25 bis 30°
(Fortsetzung).

Zeit	Kontrolle	0,01 Prom.	0,04 Prom.	0,2 Prom.	0,8 Prom.	2,0 Prom.	5,0 Prom.
2h28′	90	87	94	103	110	125	140
4 10 bis 50′	90	90	90	100	110	120	125
4 39 „ 50	90	90	94	102	110	125	140
6 02 „ 14	90	92	96	108	120	135	140
6 44 „ 56	90	96	102	120	135	140	148
8 09 „ 33	90	96	108	120	130	145	150
9 27 „ 42	90	100	104	132	170	180	180

Aus diesem Versuch bei niederer Temperatur ist die hohe Steigerung durch Natriumformiat zu ersehen, am Schluß wird eine Mehrleistung bis 100 Proz. erreicht. Durchschnittlich bringt die letzte Flasche eine Steigerung um 50 Proz. zustande. Bei Beginn tritt eine geringe Hemmung auf, die aber sehr rasch verschwindet. Im Vergleich mit der Sublimattabelle ist ein großer Unterschied in der Wirkung festzustellen. Sublimat bringt eine kurzdauernde, die Norm nicht viel übersteigende Steigerung hervor, hier zeigt sich eine dauernde, hohe Vermehrung der Kohlensäureausscheidung, die eher eine Tendenz zur Erhöhung hat. *Schulz* hat zu seinen Versuchen freie Ameisensäure verwandt, ich habe verschiedene Versuche damit angestellt, dabei stets nur eine vorübergehende, nicht 10 Proz. übersteigende Vermehrung gefunden, die also mit der hier vollbrachten Leistung nicht in Vergleich zu stellen ist. Freie Ameisensäure, ebenso Salicylsäure bringen ähnliche Resultate bei der Einwirkung auf die Hefe hervor wie die bisher besprochenen Mittel.

Versuch mit Natriumformiat bei 34 bis 42°.

65 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden der zweistündigen Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 10 mg, Flasche 3 40 mg, Flasche 4 200 mg, Flasche 5 800 mg, Flasche 6 2,0 g, Flasche 7 5,0 g Natriumformiat. Die Temperatur wird von 34° langsam auf 42° erhöht bis zur Mitte des Versuchs, so daß sie viertelstündlich um 2° stieg. Dann wurde die Flamme entfernt, wonach die Temperatur viertelstündlich um 1° fiel.

Zeit	Kontrolle	0,01 Prom.	0,04 Prom.	0,2 Prom.	0,8 Prom.	2,0 Prom.	5,0 Prom.
11h19 bis 28′	90	99	106	110	115	105	100
11 37′	90	96	106	110	115	105	100
11 46	90	90	90	94	105	103	102
11 55	90	87	93	95	96	98	95
12 10	90	90	92	93	92	98	93
12 23	90	89	93	95	98	100	96
12 36	90	89	90	90	95	98	98
12 50	90	90	93	94	98	100	96
1 03	90	95	92	95	100	102	100
1 39 bis 52	90	92	92	95	100	103	105
3 35 „ 48	90	87	95	95	98	100	104
5 50 „ 6h05′	90	90	96	98	98	100	100

Der Beginn dieses Versuchs setzt ungefähr an derselben Stelle ein wie der Versuch bei niederer Temperatur. Die Temperatur wurde langsam auf 42° erhöht, was beim Zeitpunkt 12h23 erreicht ist. Dann sinkt die Temperatur auf 35°, was bei Zeitpunkt 3h35 stattfindet. Zu Beginn zeigt sich dasselbe Bild wie bei der vorigen Tabelle. Bei 34° sind noch Steigerungen bis 28 Proz. möglich. Bei höheren Temperaturen gehen diese zurück, da die Hefe selbst geschädigt wird, trotzdem kommen noch Werte bis 100 vor. Bei absinkender Temperatur erhöht sich die Steigerung nicht mehr auf das frühere Niveau, da die Hefe endgültigen Schaden erlitten hat, was an einer eintretenden Sedimentierung zu sehen ist.

Versuch mit Thyreoidin bei 25 bis 30°.

65 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,3 g in 20 ccm Wasser aufgeschwemmte Glandula thyreoidea sicca; Flasche 3 0,6 g derselben Glandula thyreoidea *Merck*; Flasche 4 erhält eine Tablette Thyreoiddispert *Krause*; Flasche 5 zwei Tabletten; Flasche 6 sechs Tabletten; Flasche 7 zehn Tabletten Thyreoidindispert. Die Tabletten wurden fein zerrieben, in 20 ccm Wasser aufgeschwemmt und nach einiger Zeit der Hefe zugesetzt. Die Temperatur stieg während des Versuchs langsam von 25 auf 30°.

Zeit	Kontrolle	0,3 g	0,6 g	1 Tabl.	2 Tabl.	6 Tabl.	10 Tabl.
11h30 bis 48′	90	160	170	66	82	70	75
12 07′	90	140	145	80	99	76	80
12 24	90	122	129	86	96	90	84
12 37	90	102	108	92	98	94	88
12 50	90	102	106	92	100	100	90
2 03 bis 15	90	103	108	96	103	104	90
2 28	90	102	110	95	103	104	90
4 10 bis 22	90	108	120	98	103	103	90
4 35	90	118	125	96	96	96	95
6 12 bis 14	90	110	115	98	98	98	93
6 44 „ 56	90	117	118	108	109	109	102
8 09 „ 23	90	126	124	116	120	120	114
9 27 „ 42	90	135	132	129	135	140	126
9 57 „ 10h15′	90	135	132	138	146	150	136

Es wurden zweierlei Thyreoidinpräparate verwandt: Glandula thyreoidea sicca *Merck* und Thyreoiddispert *Krause*. Das *Merck*sche Präparat steigert sofort bis um 90 Proz., nach kurzer Zeit läßt die Wirkung bis auf 17 Proz. nach, um dann wieder auf 45 Proz. zu steigen. Die einzelnen Präparate verhalten sich aber verschieden, manche zeigen die Steigerung am Anfang und am Ende, andere entweder nur am Anfang oder nur am Ende. Thyreoiddispert zeigt nur die später auftretende Steigerung, außerdem wirken davon größere Dosen weniger als mittlere. Auffallend ist auch die starke anfängliche Hemmung zu Beginn des Versuchs, die das *Merck*sche Präparat auch bei Unwirksamkeit in der Steigerung zu Beginn nie aufweist. Gegenüber der Kontrolle leistet Thyreoidin im Durchschnitt optimal 45 bis 50 Proz. mehr als die Norm.

Versuch mit Thyreoidin bei 34 bis 42°.

65 g Hefe, 350 g Zucker, 7000 g Wasser werden 2 Stunden der Gärung überlassen, dann auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 0,3 g Glandula thyreoidea sicca, Flasche 3 0,6 g derselben Glandula thyreoidea *Merck*, Flasche 4 erhält eine Tablette Thyreoid-dispert *Krause*, Flasche 5 zwei Tablette, Flasche 6 sechs Tabletten, Flasche 7 zehn Tabletten Thyreoiddispert. Die Substanzen wurden fein zerrieben, in 20 ccm Wasser aufgeschwemmt und nach einiger Zeit der Hefe zugesetzt. Die Temperatur stieg von 34° viertelstündlich um 2°, bis sie 12h 23′ 42° erreichte. Dann fiel sie viertelstündlich um 1°.

Zeit	Kontrolle	0,3 g	0,6 g	1 Tabl.	2 Tabl.	6 Tabl.	10 Tabl.
11h19 bis 28′	90	105	116	118	102	92	120
11 37′	90	108	120	120	110	98	108
11 46	90	95	110	95	90	95	100
11 55	90	94	100	95	90	95	100
12 10	90	100	100	95	90	95	100
12 23	90	94	98	90	90	96	98
12 36	90	99	102	89	90	100	100
12 50	90	100	103	86	90	100	100
1 03	90	101	108	87	92	102	100
1 39 bis 52	90	103	102	91	95	102	103
3 35 „ 48	90	100	108	91	95	102	103
5 50 „ 6h05′	90	105	93	95	94	100	101

Der Versuch mit höherer Temperatur setzt umgefähr an der Stelle ein, die der Spalte 6h44 bis 56′ des ersten Thyreoidinversuchs entspricht. An dem Zeitpunkt 11h19 bis 56′ ist eine Temperatur von 34 bis 35°, wird sie nun höher, so sinken die Werte der Kohlensäureproduktion, doch bleibt auch bei ganz hoher Temperatur (42°) immer noch ein Mehr von 10 Proz. bei Zeitpunkt 12h23′. Wird die Temperatur wieder niedriger, bei 3h 34 bis 40′ herrschen 35°, dann werden die Steigerungswerte wieder erhöht, doch erreichen sie nicht wieder die Anfangshöhe, da durch die hohe Temperatur die Zellen geschädigt wurden.

Es ist sicher, daß Thyreoidin ganz anders wirkt als die bisherigen Gifte. Die Steigerung kann eine Höhe erreichen, die bisher nicht beobachtet wurde. Dazu hält die Steigerung, wenn auch nicht auf gleicher Höhe, doch fortwährend an und kann je nach der Dosis durchschnittlich 20 bis 30 Proz. betragen. Bei solcher Mehrarbeit muß bei längeren Versuchen selbstverständlich von neuem Zucker zugesetzt werden, um dadurch keine Fehlerquellen zu bedingen. Es ist dieses besser, als wenn von Anfang an größere Zuckermengen zugesetzt werden. Dann wirkt Thyreoidin auch noch bei 34° ebensogut wie bei niederer Temperatur, nur bei Erhöhung nimmt die Leistung ab wegen der eintretenden Zellschädigung. Auf die eigentliche Wirkungsweise des Thyreoidins werde ich später zurückkommen, hier wurde es nur wegen der gegensätzlichen Wirkung angeführt.

Zur Vergleichsuntersuchung wurden Substanzen gewählt, die sicher eine dauernde Steigerung bewirkten, Thyreoidin und Natrium formicicum. Thyreoidin war bisher nur in Form des Thyroxins von *Tomita* im *Neuberg*schen Institut untersucht, der eine gewisse Beschleunigung der Hefegärung feststellte, *Fränkel* benutzte einen alkoholischen Extrakt von zahlreichen tierischen Organen, darunter auch der Schilddrüse, als Vitamin, um zu

zeigen, daß diese Extrakte auf die Hefegärung beschleunigend wirken. *Euler* benutzte meist das Ammoniumformiat bei seinen Versuchen, ich wollte der Sicherheit wegen jede Stickstoffquelle ausschließen und nahm das Natriumsalz. Die Versuche wurden bei mittlerer und höherer Temperatur angestellt, um einen Vergleich mit den früheren Resultaten zu bekommen.

Bei 34° haben beide Substanzen noch ihre volle Wirksamkeit, bei derselben Temperatur steigern die anderen Gifte nicht mehr. Es besteht zwischen den vorübergehend steigernden und den dauernd steigernden nicht nur ein gradueller Unterschied, sondern der Angriffspunkt auf die Zelle muß ein anderer sein. Es ist möglich zu sagen, wie es *Neuberg* tut: Der Effekt der Acceleratoren bei der ersten Gruppe ersetzt eine Temperaturerhöhung. Leistet schon die Temperatur das Optimum, dann sind diese Steigerer ohne Wirkung.

Wurde die Vorbehandlung der Hefe verschiedenen Änderungen unterworfen, so stellte sich dabei heraus, daß die später eintretende Steigerung davon abhängig ist, ob die Hefe mehr oder weniger lang mit dem Zucker in Berührung war, ehe das Gift zugesetzt wurde. Ein verkürzter Versuch zeigt das am deutlichsten.

125 g Hefe werden mit 5600 g Wasser von 30° gemischt, häufig umgerührt und nach 1 Stunde auf sieben Flaschen verteilt. Flasche 1 wird Kontrolle; Flasche 2 erhält 2,5 g Natrium formicum, Flasche 3 0,5 g Glandula thyreoidea, Flasche 4 125 mg Jod, Flasche 5 5 mg Phosphor, Flasche 6 1 mg Kupfersulfat, Flasche 7 1 mg Sublimat. Nach 15 Minuten erhalten alle je 50 g Zucker und werden auf 1000 ccm aufgefüllt. Temperatur des Wasserbades 25°.

Zeit	Formiat	Thyreoidin	Jodkali	Phosphor	Kupfersulfat	Sublimat	Normal
11h05 bis 11'	82	95	88	90	86	89	90
11 16'	105	96	93	96	89	90	90
11 21	110	98	94	96	90	91	90
11 25	116	100	90	93	89	89	90
11 30	123	99	86	91	88	86	90
11 35	120	98	87	90	89	88	90
11 40	118	99	89	89	90	89	90
11 45	116	101	90	91	91	92	90

Dieser Versuch und andere ähnliche ergaben, daß die dauernd steigernden Stoffe auch bei dieser Vorbehandlung der Hefe ebenso wie sonst arbeiten, daß dagegen die nur vorübergehend steigernden nur die Norm erreichen. Eine kurzdauernde Mehrleistung geben Jodkali, Natriumchlorid, Phosphor, die aber nur einige Kubikzentimeter Kohlensäure ergibt. Es ist ein großer Unterschied im Verhalten der *Schulz*schen Gifte in bezug auf den Zustand der Hefe zu konstatieren. Es ist folgendes festzuhalten: Die Gruppe der vorübergehend steigernden (*Schulz*sche) Gifte sind in ihrer Wirkung abhängig von Temperatur und Vorbehandlung der Hefe, während die dauernd Steigerungen hervorrufenden ihre Wirkung nur einbüßen, wenn die Zelle mit geschädigt wird.

Betrachtet man die *Schulz*sche Gruppe näher, so läßt sich aus den Tabellen ungefähr die Überproduktion an Kohlensäure errechnen, sie

beträgt 7 bis 300 ccm, wobei von jedem Gifte die maximal arbeitende Kolonne genommen wurde. Die Frage über die Ursache dieser Mehrproduktion war nicht leicht zu beantworten. Zuerst dachte ich an eine Änderung der Bakterienflora, die mit der Hefe zusammenlebt, besonders bei den Sublimat- und Kupfersulfatversuchen. Aber die Zahl der Bakterien verändert sich nicht, überdies hat *Schiller* festgestellt, daß diese Bakterien für die Hefe dringend nötig sind zum Aufbau höherer Stickstoffverbindungen. Eine Wirkung von Nekrotinen im Sinne von *Haberlandt* und *Handovsky* kommt wohl nicht in Betracht, da sie gerade zu Beginn der Gärung am besten wirken müßten, dort ist aber gar keine Erhöhung zu konstatieren. Eine Vergiftung des Zellinnern ist wohl ebenfalls abzulehnen, da die Erholung rasch eintritt und die Zelle dauernd mit dem Gifte in Kontakt bleibt. Wie eine Vergiftung wirkt, ist in der Tabelle von Kaliumbichromat und Arsen zu sehen. Beim Einbringen der Gifte entstehen Änderungen der Konzentration, die die Löslichkeit der Kohlensäure meist vermindern, aber dies hat für das Bestimmen der fortgesetzt abfließenden Kohlensäure keine Bedeutung. So kommt nur noch eine Änderung der Zelloberfläche in Betracht. Die durch die Gifte verursachte Hemmung zeigt, daß der Austausch zwischen Zelle und Gärflüssigkeit gestört ist. Diese Störung wird langsam beseitigt, und es wird vermehrt Kohlensäure ausgeschieden. Es besteht immerhin die Möglichkeit, daß diese Kohlensäure in der Zeit der Hemmung nicht abgegeben wurde und nun zum Vorschein kommt. Es ist möglich, damit einige Resultate zu erklären, doch kommt sofort die Frage, warum kommt bei Temperaturerhöhung und anderer Vorbehandlung der Hefe ein nachträgliches Ausstoßen der durch die Hemmung zurückgehaltenen Kohlensäure nicht vor.

Die 7 bis 300 ccm Kohlensäure, die mehr gebildet werden, zeigen keine fließenden Übergänge unter den einzelnen Giften, sondern es bilden sich Gruppen: unter 10 ccm bilden Jod und Bariumchlorid; zwischen 55 und 130 ccm haben in aufsteigender Reihe Sublimat, Kaliumchlorat, Arsenik, Magnesiumsulfat, Eisenchlorid, Kaliumpermanganat, Kupfersulfat, Kaliumdichromat, Methylviolett, Höhensonne, Kaliumchlorid, Röntgenstrahlen; zwischen 280 bis 300 ccm haben Kochsalz, Phosphor, Jodkali. Weit darüber stehen Natriumsalicylat, Thyreoidin, Natriumformiat.

Bei der Glykogenreaktion mit Jod stellte sich folgendes heraus: Frisch gekaufte Hefe zeigt wechselnde, aber geringe Reaktion; Hefe nach gewöhnlicher zweistündiger Gärung zeigt sehr starke und Hefe bei 34° Temperatur oder am Ende der normalen Gärung geringe Reaktion. Um sicher die gärungsfähige Menge in der Hefe zu bestimmen, habe ich Hefe aus verschiedenen Stadien der Gärung nach vorherigem zweimaligen Ausschleudern 3 Stunden bei 34° gehalten, die in der Hefeflüssigkeit noch vorhandene Kohlensäure durch Wärme in den vorliegenden Auffangzylinder getrieben und nach Abkühlung die entstandene Gasmenge abgelesen. Es ergab sich folgende Menge Kohlensäure auf 1 g Hefe berechnet: Hefe frisch gekauft entwickelt 0,5 bis 1,5 ccm; Hefe nach 2 Stunden Gärung 7 bis 10 ccm; Hefe am Ende der Gärung 1 bis 2 ccm; Hefe nach zweistündiger Aufschwemmung in warmem Wasser ergibt keine Kohlensäure. Daraus folgt, daß die von mir vor Beginn des eigentlichen Versuchs verwandte Hefe ziemlich viel Glykogen enthielt. Hatte die Hefe Glykogen, so gab sie einen Überschuß an Kohlensäure ab, war nur wenig Glykogen vorhanden, so bildete sich nur die normale Menge. Wird die durch Umwandlung des Glykogens mögliche Kohlensäure entsprechend der Hefe-

menge eingesetzt, so ergibt sich, daß ein Überschuß bis 130 ccm auf das Glykogen zurückgeführt werden kann. Darunter fallen die meisten dei oben erwähnten Substanzen, ausgenommen Natriumchlorid, Phosphor, Jodkali, sie bilden einen Überschuß, der wahrscheinlich nicht mehr auf das Glykogen zurückgeführt werden kann. Eigenartigerweise sind diese drei Substanzen an anderer Stelle als Ausnahmen aufgetreten: Sie bewirken eine kleine Steigerung auch bei der nicht glykogenhaltigen Hefe, die aber nur sehr gering ist. Es wird wahrscheinlich sich so verhalten: sie üben einen geringen spezifischen Einfluß auf die Hefe aus, der sich bei Anwesenheit von Glykogen potenziert.

Höhere Temperatur, die *Schulz*schen Gifte, Zuckermangel der Gärungsflüssigkeit wirken auf das Glykogen vermindernd. Es ist nun klar, warum diese Gifte im Sinne einer Temperatursteigerung wirkend betrachtet werden können, aber es ist ebenso einleuchtend, warum eine Hemmung der Zuckeraufnahme im Sinne eines Zuckermangels der Gärungsflüssigkeit wirken kann. Bei beiden Vorgängen greift die Zelle auf das naheliegende Glykogen zurück. Natürlich ist es möglich, von einer Wirkung und Gegenwirkung zu sprechen, aber wir sehen, daß die Gegenwirkung eng beschränkt ist.

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse sieht es aus, als ob *Schulz* wenigstens theoretisch Recht hat und manche seiner Versuchsergebnisse doch in diesem Sinne verwandt werden können. Er bekommt bei seinen Versuchen starke Ausschläge, die er auf die Wirkung kleiner Dosen zurückführt. Bei meinen Versuchen kommen nur kurzdauernde Steigerungen bis 20 Proz. vor (*Schulz*sche Gruppe), aber ganz vereinzelt, meist geht das Optimum nur bis 10 Proz. Und diese Überproduktion kann in einem Zeitraum von 4 bis 12 Minuten sich abspielen, um dann zurückzugehen. *Schulz* beobachtet nur alle 15 Minuten und erhält dabei Ausschläge im Durchschnitt von 4 mm Quecksilber. Er kann schätzungsweise noch $\frac{1}{2}$ mm bestimmen, 10 Proz. Mehrleistung geben aber nur 0,4 mm Ausschlag, was auf seiner Skala nicht abzulesen ist. Es ist praktisch unmöglich, mit seiner Apparatur die hier gefundenen Resultate zu gewinnen, die im Durchschnitt nur einige Prozente Mehrleistung betragen. Auch seine theoretische Betrachtung ergibt andere Ergebnisse, als das hier gefundene. *Schulz* meint, bei jedem Versuch gibt eine Konzentration ein Optimum, die daneben liegenden Konzentrationen sind aber unwirksam, sie bewegen sich auf dem Indifferenzpunkt. Meine Versuche zeigen eine mögliche Steigerung durch eine größere Anzahl von Konzentrationen, von denen natürlich nicht alle dieselbe Höhe erreichen. Die einzelnen Gifte wirken aber auch nicht gleichartig; bei den einen tritt die Reaktion schnell ein, bei den anderen fällt sie schnell ab. Außerdem ist auch eine spezifische Giftwirkung zu konstatieren, die den Eintritt der Steigerung gar nicht oder nur wenig aufkommen läßt, wie beim Bariumchlorid und Jod.

Von einer Besprechung der dauernd steigernd Wirkenden wird hier abgesehen, da sie nicht in den *Schulz*schen Gedankenkreis gehören und einen ganz anderen Angriffspunkt haben, sie wurden nur herangezogen, um den Gegensatz zu zeigen.

Zusammenfassend ist zu sagen: Es ist möglich, durch die von *Schulz* untersuchten Gifte und andere dazugehörige unter bestimmten Umständen eine vorübergehende Steigerung zu bekommen. Sie ist aber sehr mäßig und abhängig vom Glykogenvorrat der Hefe. Eine größere Steigerung, die nur teilweise mit dem Glykogenvorrat in Zusammen-

hang steht, bewirkt das Natriumchlorid, Jodkali und der Phosphor. Eine vergiftende Wirkung zeigen Bariumchlorid und Kaliumdichromat. Die dauernd Steigernden werden erst später besprochen, da sie ganz anders wirken. Es würde nicht nötig sein, auf diese Versuchsergebnisse so einzugehen, wenn nicht *Schulz* weittragende Schlüsse gezogen hätte und auf dieses wissenschaftliche Ergebnis ein ganzes therapeutisches Gebäude aufbaute; sogar die Homöopathie, ein Teil der „Biochemiker" zieht zum Beweis das *Arndt-Schulz*sche Gesetz heran, aber auch Vertreter der Schulmedizin haben eine Vorliebe dafür, nur mit der Bezeichnung Regel anstatt Gesetz. Es ist auch bestechend einfach und überzeugend. Hätte ich in der praktischen Anwendung nicht die Mißerfolge gesehen, so wäre ich nie darauf gekommen, die Grundlagen nachzuprüfen. Was mit der *Schulz*schen Methode nicht möglich war, habe ich hier mit einer feineren Methode untersucht, habe auch Steigerung gefunden, im Gegensatz zu *Schulz* in einer ziemlichen Konzentrationsbreite, aber diese Steigerung ist so gering , daß sie für einen biologischen Prozeß gar nichts sagt. Außerdem tritt sie nur unter ganz günstigen Bedingungen auf. *Schulz* sagt: „Jeder Umstand, der das physiologische Gleichgewicht einer Zelle oder eines Gemeinwesens von Zellen stört, wirkt als Reiz. Die Zellen antworten auf jeden Reiz, der sie trifft und dabei ein gewisses Maß von Intensität besitzt, durch Veränderung ihrer Tätigkeit." Der Ausgangspunkt dieser Überlegungen waren die hier nachgeprüften Hefeversuche, durch die er das biologische Grundgesetz erwiesen glaubt. Aber sie erweisen gerade das Gegenteil. Die Gifte hemmen stets, was sicher eine Störung des physiologischen Gleichgewichts der Zelle bedeutet; also müßten alle, unabhängig vom Glykogengehalt, eine auf die Hemmung folgende, dieser adäquate Steigerung aufweisen. Das ist aber nicht der Fall.

In der jetzigen Literatur tauchen immer wieder die *Schulz*schen Zahlen auf, es werden immer die Sublimatversuche angeführt und gesagt, daß Sublimat in kleinen Dosen 1 : 700000 die Kohlensäurebildung der Hefe vermehrt. In einem eben erschienenen Büchlein von *Gutherz* habe ich das wieder gefunden. Er versucht außerdem, das *Arndt-Schulz*sche Gesetz mit der *Weigert*schen Lehre von der primären Gewebsschädigung zu verbinden, und meint, bei beiden ist der Grundgedanke, daß durch eine minimale Schädigung der Zelle eine Reizung stattfindet, hier durch Nekrotine, dort durch Gifte. Diese löst eine Superregulation aus und führt so zu einer Hyperbiose. Eine ähnliche Anschauung vertritt *Czapek*, der in dem stimulierenden Effekt von dünnen Giftlösungen einen autoregulatorischen Vorgang erblickt. Diese Anschauung könnte insofern richtig sein, als die Hemmung bei den glykogenhaltigen Zellen schneller überwunden wird, außerdem ertragen sie eine stärkere Giftkonzentration: Hefe mit Glykogen erholt

sich noch bei einer Konzentration von 1 : 50000 Sublimat und 1 : 25000 Kupfersulfat, für Hefe ohne Glykogen sind die entsprechenden Zahlen 1 : 83000 und 1 : 50000.

So muß die von *Schulz* in bezug auf die Hefe vertretene Anschauung, daß schwache Reize anfachen, mittlere steigern und starke hemmen, als allgemeingültig abgelehnt werden. Es gibt bestimmte Substanzen seiner Gruppe, die vorübergehend steigernd wirken können, andere können unter bestimmten Umständen Steigerung vortäuschen, aber nie konnte ein Versuchsergebnis als Reizwirkung ausgedeutet werden. Das *Arndt-Schulz*sche Gesetz hat, wie *Handovsky* sagt, eine Art Berechtigung, nur in der Zone der eben reizenden und tötenden Konzentrationen, da sagt es nichts Neues; sonst ist es nicht anwendbar. *Joachimoglu* meint, wenn es gelänge nachzuweisen, daß kleine Konzentrationen steigern können, dann hätte das Gesetz seine Berechtigung. Hier ist nachgewiesen, daß unter bestimmten Umständen das möglich ist, aber gleichzeitig wurde auch die eigentliche Ursache der Steigerung nachgewiesen. Ein biologischer Effekt, der nur einige Prozent im Höchstfall erreicht, kann nicht als Reiz angesprochen werden.

Die folgende Betrachtung faßt am besten die Ergebnisse zusammen: Durch den Zusatz der Gifte wird der Stoffwechselaustausch der Hefe gehemmt; die Größe der Hemmung wird durch die Konzentration der Gifte bestimmt. Durch Vergärung der in der Zelle noch vorhandenen Substanzen gelingt es ihr, allmählich die Hemmung zu überwinden. Ist viel Glykogen vorhanden, so wird viel Kohlensäure gebildet und die Hemmung um so schneller überwunden. Je schneller das geschieht, um so mehr tritt die Glykogenkohlensäure in Erscheinung. Je größer die im Innern der Zelle gebildete Kohlensäuremenge ist, eine desto größere Hemmung kann sie überwinden.

Ergebnis: Die Versuche von *Schulz* sind fehlerhaft, die Resultate sind nicht verwertbar.

Die von *Schulz* verwandten Gifte bewirken erst eine Verminderung der Kohlensäurebildung, die sich nach einiger Zeit auf die frühere Höhe erhebt. Bei Beginn der Gärung, am Schluß derselben und bei höherer Temperatur enthält die Hefe wenig Glykogen. Wird die Hefe mit Glykogen angereichert, so wird diese bei einer Hemmung der Zuckerzufuhr vergoren und kann eine Steigerung der Kohlensäurewerte bedingen.

Natriumchlorid, Jodkali, Phosphor bewirken eine kleine eigentliche Steigerung, die bei Gegenwart von reichlich Glykogen potenziert wird.

Literatur.

Abderhalden, Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. XII, Heft 1: *Pringsheim*, *Bau*, *Linder*. — *Abderhalden* und *Schaumann*, Pflügers Arch. f. ges. Physiol. 172, 1. — *Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 142. — *Euler* und *Cassel*, ebendaselbst 86, 122. — *Fränkel* und *Schwarz*, diese Zeitschr. **112**, **203**. — *Fränkel* und *Hager*, ebendaslebst **126**, 189. — *S. Gutherz*, Der Partialtod. Jena 1926. — *Haberlandt*, Biol. Zentralbl. **42**. — *Handovsky*, Münch. Med. Wochenschr. 1925, S. 652; Klin. Wochenschr. 1925, S. 1650. — *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **180**, 238. — *Neuberg*, ebendaselbst **88**, 145. — *Neuberg* und *Ehrlich*, ebendaselbst **101**, 239. — *Oppenheimer*, ebendaselbst **98**, 125. — *Klövekorn*, Strahlentherapie **20**, Heft 2. — *Krawkow*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. **84**, 279. — *Kolisko*, Nachweis der Wirksamkeit kleinster Entitäten. Stuttgart 1923. — *Sandberg*, diese Zeitschr. **128**, 76. — *Schiller*, Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., Abt. I, Orig., **92**, 124. — *Schneider*, Strahlentherapie **20**, Heft 4. — *Schulz*, Pflügers Arch. f. Physiol. **42**, 517. *Süpfle*, Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., Abt. I, Orig., **89**, 112. — *Tomita*, diese Zeitschr. **181**, 175. — *Czapek*, Biochemie der Pflanzen **1**, 1913. — *Schulz*, Unorganische Arzneistoffe, 1907.

Der Mechanismus der Insulinwirkung.

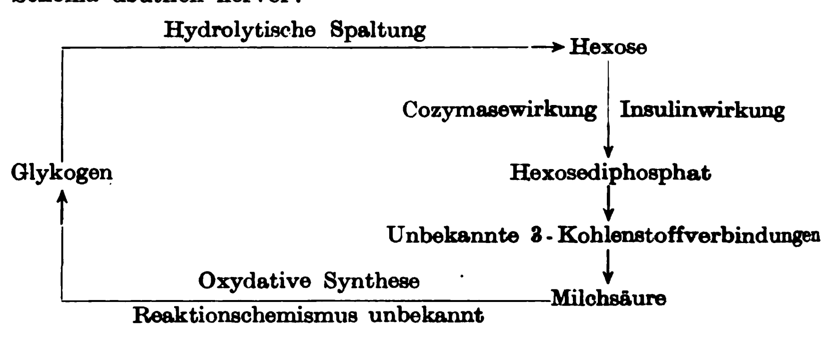
Von

Artturi I. Virtanen.

(Aus dem Laboratorium der Butterexportgesellschaft Valio m. b. H., Helsinki.)

(Eingegangen am 15. Februar 1926.)

Aus dem Befund[1]), daß Insulin die Cozymase bei den Milchsäurebakterien ersetzen kann und folglich als Cozymase wirksam ist, habe ich die Schlußfolgerung gezogen, *daß das Insulin den Zuckerabbau im Organismus fördert, indem es die Zymophosphatbildung aktiviert.* Durch die Zymophosphatbildung wird die Milchsäuregärung wie auch die Milchsäurebildung im Organismus und die alkoholische Gärung eingeleitet, und das Insulin ist darum bei diesem ersten Gärungsstadium tätig. Meine Auffassung von der Insulinwirkung im Organismus geht aus folgendem Schema deutlich hervor:



Die direkte Einwirkung des Insulins ist auf die Aktivierung der Synthese von Hexosediphosphat beschränkt. Welche Bedeutung diese Verbindung bei den Gärungen hat, ist noch nicht klar. So viel scheint festzustehen, daß die Milchsäuregärung — wie auch die alkoholische Gärung — ohne Bildung von Hexosediphosphat nicht abläuft und daß der Zuckerphosphorsäureester als Zwischenprodukt der Milchsäuregärung zu betrachten ist. Wird nun aber die Bildung eines Zwischenprodukts aktiviert, so ist zu erwarten, daß die Bildung des Endprodukts, Milchsäure, auch gefördert wird.

Der Insulininjektion sollte also die Verminderung des freien Phosphats und eine Erhöhung der Milchsäure folgen. In der Tat wird

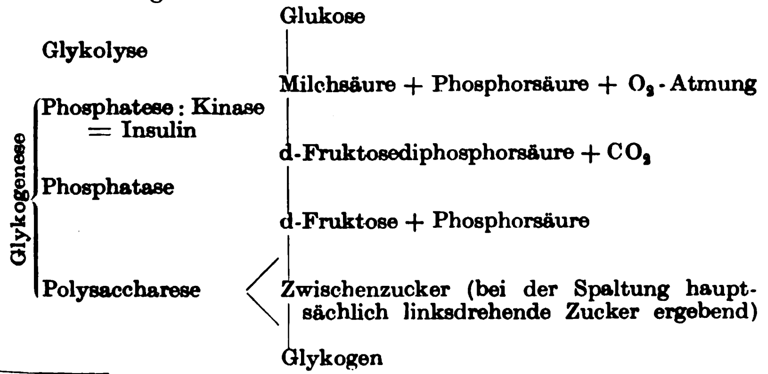
[1]) *Virtanen*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **58**, 696, 1925.

nach der Insulininjektion — mindestens bei größeren Dosen, durch welche die Insulinwirkung am deutlichsten zum Vorschein kommt — stets eine deutliche Milchsäuresteigerung im Blute beobachtet, wie aus den Bestimmungen von *Kuhn* und *Baur*[1]) u. a. deutlich hervorgeht.

Das freie Phosphat sinkt normal auch durch Insulin unter Bildung von Hexosediphosphorsäure[2]), wie unsere Hypothese voraussetzt. Daß die Zunahme von Zymophosphat gewöhnlich nicht stark ist, läßt sich leicht durch die Annahme erklären, daß die Spaltung des Hexosediphosphats etwa in dem Maße wie die Synthese beschleunigt wird. Bei den Gärungen kommt auch häufig die Cozymasewirkung nur als Gärungsbeschleunigung zum Vorschein.

Nach dem obigen Schema steht die Insulinwirkung in keinem direkten Zusammenhang mit Glykogen-auf- oder -abbau. Als Folge der Blutzuckersenkung ist jedoch zu erwarten, daß die hydrolytische Spaltung des Glykogens gesteigert und die Glykogenmenge dadurch vermindert wird. Eine Glykogensteigerung ist aber auch nicht ausgeschlossen. Bei kleineren Insulindosen kann die Blutzuckerverminderung in einem langsameren Tempo als der oxydative Aufbau des Glykogens aus Milchsäure vor sich gehen, wodurch eine Glykogensteigerung möglich wird. Die widersprechenden Resultate mehrerer Forscher betreffend den Glykogengehalt der Leber wären dadurch erklärlich.

Etwa zur selben Zeit, als ich die obige Annahme von der Insulinwirkung dargelegt hatte, kamen *Brugsch* und *Horsters*[3]) auch zu dem Schluß, daß Insulin ein Aktivator der Phosphatese ist. Sie fassen die Insulinwirkung jedoch ganz anders als ich auf, wie aus ihrem Schema[4]) deutlich hervorgeht:



[1]) *Kuhn* und *Baur*, H. 141, 68, 1924.
[2]) *Audowa* und *Wagner*, Soc. Biol. 90, 308, 1924; *Lawaczeck*, Klin. Wochenschr. 4, 1858, 1925; *Maikoff, Macleod, Markowitz* und *Simpson*, Amer. Journ. Physiol. 74, 36—48, 1925 u. a.
[3]) *Brugsch* und *Horsters*, diese Zeitschr. 155, 459, 1925.
[4]) *Brugsch, Horsters* und *Vorschütz*, ebendaselbst 158, 166, 1925.

Das Insulin fördert nach diesen Forschern den Glykogenaufbau, indem es die Hexosediphosphatbildung aus Milchsäure aktiviert. Wenn *Brugsch* und *Horsters* in einer späteren Mitteilung[1]) schreiben: „*Virtanen* kommt daher seinerseits zu dem gleichen Schluß, den wir mit Evidenz aus unserer achten Mitteilung gezogen hatten, daß das Insulin den Zuckerabbau im Organismus fördert, indem es die Zymophosphatbildung aktiviert", so kann ich ihren Satz nicht billigen, weil sie nicht zu dem gleichen Schluß wie ich gekommen sind.

Was dann den Zusammenhang zwischen Insulin und Cozymase betrifft, so kann man konstatieren, daß Insulin und Cozymase im allgemeinen sich gegenseitig nicht ersetzen können. Das geht aus den Untersuchungen von *Euler* und Mitarbeitern[2]) schon deutlich hervor. Insulin und Cozymase sind also miteinander nicht vollständig identisch. Ob die Unterschiede zwischen den beiden Stoffen auf die Begleitstoffe zurückzuführen sind, ist noch unklar. Aus der Tatsache, daß die Cozymase dialysiert, das Insulin dagegen nicht, könnte man vielleicht den Schluß ziehen, daß Insulin mit einem Begleitstoff durch Adsorption eng verbunden ist und deshalb als Cozymase bei den Gärungen im allgemeinen nicht funktionieren kann. Weil das Blut gewaschene Trockenhefe nicht aktiviert und folglich die Cozymase der Hefe nicht enthält, ist es anzunehmen, daß ein anderes, Phosphatase aktivierendes Coenzym im Blute vorkommt. Hexosediphosphatbildung im Blute wäre ohne solchen Aktivator nicht erklärlich. Nach meiner Auffassung ist das Insulin als eine für Blut geeichte Cozymase zu betrachten[3]).

---

[1]) *Brugsch* und *Horsters*, diese Zeitschr. **164**, 191, 1925.

[2]) *v. Euler* und *Myrbäck*, Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 57, 1925; *v. Euler, Jorpes* und *Myrbäck*, H. **149**, 60, 1925.

[3]) *Virtanen* und *Karström*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **59**, 45, 1925.

Die aktuelle Reaktion des Gewebssaftes bei normaler und beschleunigter Metamorphose von Rana temporaria.

Von

B. W. Aleschin.

(Aus dem Laboratorium der Hydro-Physiologischen Station Zwenigorod.)

(Eingegangen am 16. Februar 1926.)

Es läßt sich schon a priori erwarten, daß bei der Metamorphose, wenn sich die Struktur und die funktionelle Tätigkeit der Larve der Kaulquappe beim Übergang in die definitive Form von Grund aus verändert, große Veränderungen des physikalisch-chemischen Zustandes des ganzen Organismus eintreten müssen, die einen Ausdruck der Veränderung der Plasmakolloide bilden.

Um die physikalisch-chemische Analyse der Erscheinungen der Metamorphose in Angriff zu nehmen, sind wir bei der Aufklärung des Verhaltens der aktuellen Reaktion des Gewebssaftes stehengeblieben, da die Konzentration der Wasserstoffionen einer der wichtigsten Faktoren ist, welche die Lebenstätigkeit der Zelle regulieren. Da das Thyreoidin eine schroffe und stürmische Beschleunigung der Metamorphose hervorruft, wurden gleichzeitig Untersuchungen sowohl über die normale Metamorphose, als auch über eine durch Thyreoidin beschleunigte angestellt, um festzustellen, inwiefern die erwarteten Veränderungen der aktuellen Reaktion des Gewebssaftes sich als für die Metamorphose charakteristisch erweisen.

Die aktuelle Reaktion des Gewebssaftes wurde nach der Methode von *Gräff* kolorimetrisch festgestellt, vermittelst der Indikatoren von *Clark* (Brom-Thymol-Blue, Phenol-Red und Brom-Cresol-Purple), unter Zuhilfenahme von *Sørensens* Pufferlösungen. Die zur Feststellung der Reaktion bestimmte Kaulquappe wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Filtrierpapier abgetrocknet. Dann wurde schnell ein Längsschnitt an der Ventralseite vorgenommen und alle Eingeweide entfernt, da der Inhalt des Darms zu einer starken Veränderung der Reaktion führen könnte. Dabei wurde unumgänglich

das Herz entfernt, wodurch die Entblutung erreicht wurde, da die Hauptmasse des Blutes im Herzen enthalten ist.

Das Körperchen der Kaulquappe wurde dann in einer Porzellanschale untergebracht, mit einer scharfen Schere angeschnitten, um den Gewebssaft herausfließen zu lassen, und sofort mit einer Lösung des Indikators begossen. Die ganze Bestimmung dauerte 2 bis 3 Minuten, und während eines so geringen Zeitraumes konnten keinerlei bedeutende Veränderungen der Reaktion vor sich gehen.

Im ganzen wurden über 800 Messungen vorgenommen, von denen keine einzige einen Widerspruch zutage treten ließ.

Die Untersuchung wurde von dem Stadium des Erscheinens der Anlagen der hinteren Extremitäten an begonnen, da wir in unserer früheren Arbeit (*B. Aleschin*, Some Observations on the Accelerated Metamorphosis by Rana temporaria, Journ. de Biol. expér., Bd. I, S. 52) die Möglichkeit hatten, nachweisen zu können, daß gerade seit diesem Moment die Kaulquappe eine besondere Empfindlichkeit der Wirkung des Inkretes der Thyreoidea gegenüber äußert; die Metamorphose tritt in 2 bis 3 Tagen nach einmaliger Verabreichung des Präparats ein.

In jeder Serie wurden parallele Messungen von thyreoidierten und Kontroll-Individuen vorgenommen (täglich und in vielen Fällen auch zweimal am Tage).

Ferner sind Untersuchungen an Kaulquappen, die ihre Metamorphose normal vollziehen, vorgenommen worden. Da die Ergebnisse dieser Messungen grundlegende Bedeutung haben, so müssen wir zuerst bei diesen stehenbleiben.

Man konnte mit völliger Deutlichkeit feststellen, daß die normale Metamorphose durch einen jähen Sprung der aktuellen Reaktion des Gewebssaftes nach der aciden Richtung hin gekennzeichnet ist. Vor der Metamorphose war die p_H des Gewebssaftes der Kaulquappe gleich 7,1 bis 7,2, d. h. die Reaktion war schwach alkalisch. Diese Höhe des p_H bleibt im Laufe der ganzen Untersuchung vom Beginn des Experiments bis zum Eintritt der Metamorphose erhalten. Sobald nur die letztere beginnt, fällt die p_H sofort bis zu 6,6 bis 6,7. Dabei ist es von Wichtigkeit, zwei charakteristische Momente zu vermerken. Erstens ist die Zunahme der Acidität des Gewebssaftes das erste genau feststellbare Kennzeichen der Metamorphose. Überhaupt meint man gewöhnlich, daß die Metamorphose mit dem Moment des Abfallens der Hornkiefer beginnt. Es erweist sich, daß das Sinken von p_H einige Stunden früher und im äußersten Falle gleichzeitig mit dieser Erscheinung beginnt. Auf diese Weise können wir, falls eine Zunahme der Acidität des Gewebssaftes festgestellt ist, behaupten, daß die gegebene Kaulquappe schon ihre Metamorphose begonnen

hat, obgleich an ihr noch keine äußeren morphologischen Kennzeichen dafür zu bemerken sind.

Zweitens vollzieht sich dieser Zuwachs von Acidität auf einmal, ohne irgendwelche Übergangsstadien. Der gesamte Zyklus der Metamorphose war in 8 Stadien eingeteilt (je nach dem Grade des äußeren Hervortretens des Prozesses) und die aktuelle Reaktion jedes Stadiums wurde nach einer genügend großen Anzahl von einzelnen Vermessungen festgestellt (alle Vermessungen haben sich als identisch erwiesen). Man konnte keinerlei Unterschied in der aktuellen Reaktion der verschiedenen Stadien feststellen, p_H war für alle 6,6 bis 6,7 gleich. Eine derartige Reaktion tritt sofort bei Beginn der Metamorphose ein und hält sich während der ganzen Zeit. Die aktuelle Reaktion des Gewebssaftes des Frosches, der eben die Metamorphose durchgemacht hat, ergibt $p_H = 6{,}6$.

So verläuft der Prozeß bei normaler Metamorphose. Nach Feststellung dieser Tatsachen entsprang natürlich sofort die Frage, in welchem Maße der beobachtete Zuwachs der Acidität des Gewebssaftes für die Metamorphose typisch ist, d. h. ob derselbe eine zufällige, nur dem Zeitpunkt nach mit der Metamorphose zusammenfallende Erscheinung ist, oder ob er mit letzterer eng verbunden ist. Eine Antwort darauf kann bei Beobachtung einer experimentell zu einer von der Norm abweichenden Zeit hervorgerufenen Metamorphose gegeben werden. Da das sicherste Mittel zur Beschleunigung ein Inkret von Thyreoidea ist, so haben wir die Bearbeitung mit diesem Agens angewandt.

Ohne hier auf die Einzelheiten der Experimente einzugehen (die in meiner vollständigen Arbeit, welche zurzeit zur Drucklegung vorbereitet wird, ausführlich dargestellt sind), will ich nur angeben, daß als Präparat von Thyreoidea das Thyreoidin von *Poel* angewandt worden ist, wobei die gewöhnliche Dosierung für das Individuum 0,002 g gleich war. Die Metamorphose begann am dritten Tage nach Verabreichung des Präparats und hatte einen vollkommen typischen Verlauf.

Die Bestimmung von p_H des Gewebssaftes hat auch in diesem Falle eine jähe Steigerung seiner Acidität bis $p_H = 6{,}7$ bis 7,8 aufgedeckt; wobei ebenso wie bei normaler Metamorphose die Veränderung von p_H sofort, ohne Übergangsstadien, vor sich geht.

Die Messungen wurden (bei Beginn der Metamorphose) zwei- bis dreimal täglich vorgenommen, bei einigen Experimenten auch öfters nach Ablauf von 1 bis 2 Stunden, jedoch konnte man keinmal Übergänge beobachten — das Fallen von p_H vollzieht sich plötzlich und sofort bis zur endgültigen Größe.

Bei Variation des Quantums von Thyreoidin sind wir zu folgenden Ergebnissen gelangt. Bei starker Hyperdosierung, wenn die Metamorphose stürmisch eintritt, aber schnell aufhört (vgl. *Romeis*, Arch. f. mikr. Anat. u. Entwicklungsmech. 98, 1923), hat sich der Umfang der Verschiebung der Reaktion als ein geringerer erwiesen, nämlich bis $p_H = 6{,}9$. Im Gegenteil, im Falle einer Hypodosierung, wenn die Metamorphose bis ungefähr zu

ihrem Mittelpunkt verläuft und dabei stehenbleibt, ist der Umfang der Verschiebung derselbe wie bei der gewöhnlichen Dosierung, d. h. er geht bis $p_H = 6{,}7$ bis 6,8.

Ebenso wie bei normaler Metamorphose ist das Fallen der aktuellen Reaktion das erste Kennzeichen des Eintritts der Metamorphose.

Alle Experimente (und es sind ihrer acht Serien veranstaltet worden), haben vollständig übereinstimmende Resultate ergeben.

Auf Grund dieser sind wir zu folgenden Schlüssen gelangt:

1. Den Daten von *V. Růžička* (Arch. f. mikr. Anat. u. Entwicklungsmech. **101**, 1924) zuwider, ist die Metamorphose von einer plötzlichen Verschiebung der aktuellen Reaktion nach der Seite der Acidität hin begleitet (von $p_H = 7{,}1$ bis $p_H = 6{,}6$).

2. Diese Veränderung der Reaktion ist ein vollständig sicheres Kennzeichen der Metamorphose und dabei das erste dem Eintritt nach gerechnet.

3. Das Steigen der Acidität des Gewebssaftes ist, wie man annehmen muß, nicht Ursache, sondern Folge der Metamorphose, da:

a) Bei Beschleunigung der Metamorphose durch Thyreoidin der Umfang der Reaktionsverschiebung trotz stürmischen Verlaufs des Prozesses der frühere ist. Falls die Steigerung der Acidität die Metamorphose hervorriefe, würde für deren schnelleren und früheren Eintritt eine größere Aciditätszunahme erforderlich sein, in Wirklichkeit ist diese der normalen gleich oder sogar geringer.

b) Besonders scharf tritt das bei Hyperdosierung zutage, wo trotz sehr stürmischen Verlaufs des Prozesses die Veränderung der Konzentration der Wasserstoffionen bedeutend geringer als die normale ist.

Selbstverständlich kann man letztere Schlüsse nur als Vermutungen aussprechen, da sie eine experimentelle Behandlung erfordern. Wir hoffen, daß diese Fragen das Thema unserer künftigen Arbeit sein werden, die wir in diesem Jahre wegen Mangels an Material nicht durchführen können.

Die Beeinflussung der Zuckerbildung der Froschleber durch homologe Alkohole. III.

Von

E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 17. Februar 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

I.

In einer kurzen Mitteilung in Pflügers Archiv **211**, 336, 1926, in der *Artur Linksz* zu der Kritik, die ich an seiner ersten Arbeit üben mußte, Stellung zu nehmen versucht, schreibt er: „Als Durchströmungsflüssigkeit verwendete ich nicht, wie *Lesser*, „physiologische" Kochsalzlösung, nicht einmal Ringerlösung, sondern die von *Barkan*, *Broemser* und *Hahn* angegebene Kohlensäure-Bicarbonat-gepufferte modifizierte Ringerlösung mit einem p_H von 7,25"[1]). Daß ich eine reine Kochsalzlösung statt Ringerlösung benutzte, geschah natürlich nicht ohne vorherige Prüfung, ob dies experimentell erlaubt war. Ich hatte früher gezeigt[2]), „daß es für die Zuckerabgabe der Leber gleichgültig ist, ob man sie mit Chlornatrium- oder Ringerlösung durchströmt", woraus ein unvoreingenommener Leser sofort bemerken mußte, daß die Permeabilität der Leberzellmembran für die von mir untersuchten Beeinflussungen der Zuckerabgabe keine Bedeutung hat. Die *Barkan-Hahn-Broemser*sche Durchströmungsflüssigkeit, welche sich von den von mir benutzten erstens durch ihren Phosphatgehalt, zweitens aber dadurch unterscheidet, daß sie erheblich alkalischer ist, hatte ich noch nicht geprüft. Deshalb schien es mir gut, auch einige Versuche mit dieser Durch-

[1]) Der Satz von *Linksz* enthält zwei Unrichtigkeiten. Ich habe niemals von „physiologischer" Kochsalzlösung gesprochen, sondern stets nur von 0,7proz. Ferner verlangen *Barkan*, *Hahn* und *Broemser* für die von ihnen angegebene Lösung zur Durchströmung der Froschniere ein p_H von 7,60, während *Linksz* 7,25, also erheblich weniger alkalisch angibt. *Barkan*, *Broemser* und *Hahn*, Zeitschr. f. Biol. 74, 1, 1921.

[2]) Diese Zeitschr. 119, 116, 1921.

strömungsflüssigkeit anzustellen, deren p_H meist durch die Gaskette nach *Michaelis*, gelegentlich auch nach der *Sörensen* schen Indikatoren methode vor und nach dem Versuch bestimmt wurde.

Da die Herstellung des Kohlensäure-Sauerstoffgemisches mit den von *Barkan* und Mitarbeitern angegebenen sehr einfachen und bequemen Mitteln nicht sehr genau sein kann, habe ich die Zusammensetzung des Gases, das rund 3 Proz. Kohlensäure enthalten soll, stets durch Gasanalyse im *Haldane*-Apparat vor Beginn des Versuchs geprüft. Abgesehen von der Veränderung, welche die Durchströmungsflüssigkeit betraf, war die Versuchsmethodik genau die gleiche wie in den in der zweiten Mitteilung[1]) beschriebenen Versuchen. Es wurden zwei Versuchsreihen angestellt, die eine bei p_H 7,60 (Original-Barkanlösung), die andere bei p_H 7,4 (erhöhte CO_2-Spannung). Letzteres geschah, weil eine p_H von 7,6 schon recht weit vom Optimum der Diastase entfernt liegt und ich früher die p_H der Froschleber als zwischen 6,92 und 7,08 liegend geschätzt hatte. Als oberflächenaktiver Stoff wurde dieses Mal nur Propylalkohol gewählt; die Verdünnung wurde in folgender Weise hergestellt: In einem 400-ccm-Meßkolben wurden etwa 370 ccm der noch nicht mit dem CO_2, O_2-Gemisch gesättigten Barkanlösung gegeben. Hierzu wurden unter starkem Schütteln tropfenweise 19,6 ccm Propylalkohol zugesetzt, dann mit Barkanlösung auf 400 ccm aufgefüllt und nunmehr in der Durchströmungsflasche mit dem CO_2, O_2-Gemisch gesättigt. Wenn man so verfährt, bekommt die Lösung höchstens eine Opaleszenz, aber es kommt nicht zu einem Ausfallen von Calciumsalzen.

Die Versuche wurden sämtlich in den ersten beiden Februarwochen angestellt. Dies war dadurch möglich, daß die als Versuchstiere dienenden Frösche, welche im Oktober vorigen Jahres gefangen waren, im Freien in einer tiefen mit Moos gefüllten Grube gehalten wurden, in der sie einen natürlichen Winterschlaf durchmachten. Etwa 3 bis 4 Tage vor dem Versuch wurden die Tiere aus der Grube genommen und kamen in einen ungeheizten Raum bei etwa 10° Außentemperatur in Gefäße mit Wasser. Ihre Lebern waren sehr glykogenreich, enthielten zwischen 10 und 20 Proz. Glykogen. Zu bemerken ist noch, daß die Durchströmungsgeschwindigkeit etwas erhöht wurde, so daß in allen Versuchen etwa 1 ccm pro Minute durch die Leber lief.

II.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen sind in Tabelle I und den Abb. 1 und 2 wiedergegeben.

---

[1]) Diese Zeitschr. **156**, 161, 1925.

Tabelle I.

Versuch	Zuckerabgabe in mg pro 100 g Leber in Periode								p_H der Barkanlösung	Bemerkungen
	1	2	3	4	5	6	7	8		
A	126	80	470	540	320	250	—	—	7,60	Zu Beginn der Periode 3 läuft 20′ lang Propylalkohol-Barkanlösung durch die Leber.
B	141	54	116	192	95	108	—	—	7,60	Zu Beginn der Periode 3 läuft 10′ lang Propylalkohol-Barkanlösung durch die Leber.
C	75	47	154	127	39	62	—	—	7,60	Wie bei Versuch B.
D	120	100	81	54	50	69	96	—	7,60	Normalversuch.
E	133	133	320	315	199	152	—	—	7,40	Zu Beginn der Periode 3 läuft 15′ lang Propylalkohol-Barkanlösung durch die Leber.
F	186	145	470	435	205	136	114	104	7,40	Zu Beginn der Periode 3 läuft 20′ lang Propylalkohol-Barkanlösung durch die Leber.
G	136	—*)	88	133	154	146	130	110	7,40	Normalversuche.
H	166	162	170	104	111	107	107	96	7,40	Normalversuche.

*) Bestimmung verloren.

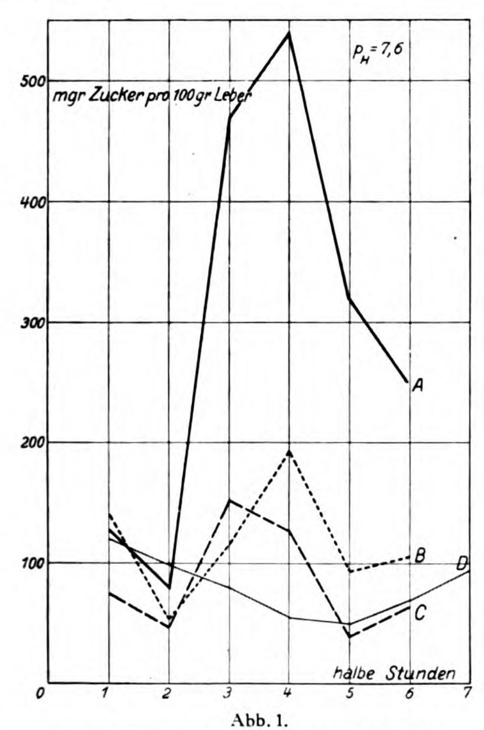


Abb. 1.

—— Versuch A zu Beginn der 3. Periode läuft 20 Minuten lang Propylalkohol-Barkanlösung durch die Leber.

······ Versuch B } Zu Beginn der 3. Periode läuft 10 Minuten lang
- - - - Versuch C } Propylalkohol-Barkanlösung durch die Leber.

– – Versuch D. Es läuft während des ganzen Versuches unveränderte Barkanlösung durch die Leber.

p_H sämtlicher Versuche 7,60.

Die Tabelle und die Abbildungen zeigen, daß die Durchströmung der Froschleber mit der *Barkan-Hahn-Broemser*schen Lösung bei Zusatz von Propylalkohol in einer Menge von 4,9 ccm auf 100 ccm Lösung genau dieselbe Wirkung auf die Froschleber hat, wie die Durchströmung mit reiner 0,7 proz. Kochsalzlösung und Propylalkohol. Man erhält in beiden Fällen mit absoluter Regelmäßigkeit eine Steigerung

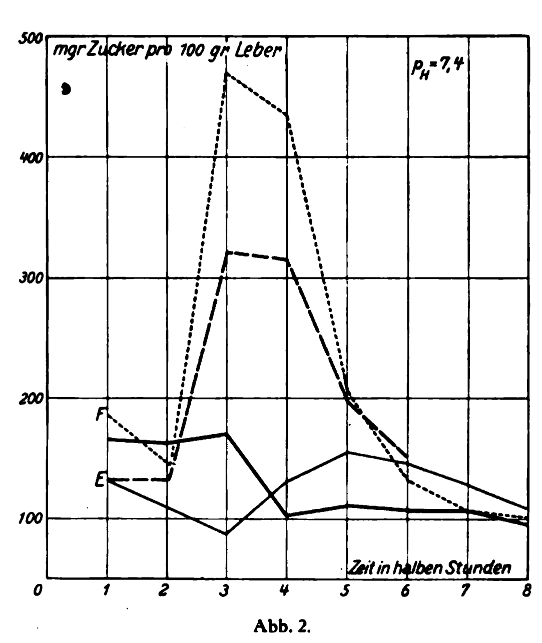


Abb. 2.

----- Versuch E. Zu Beginn der 3. Periode läuft 15 Minuten lang Propylalkohol-Barkan durch die Leber.
········· Versuch F. Zu Beginn der 3. Periode läuft 20 Minuten lang Propylalkohol-Barkan durch die Leber.
—— Versuch G und H. Kontrollversuche mit reiner Barkanlösung.
p_H sämtlicher Versuche 7,40.

der Zuckerabgabe auf das Dreifache und mehr, und nach kürzerer oder längerer Zeit kehrt die Zuckerabgabe wieder zur Norm zurück, d. h. die Beeinflussung ist reversibel. Nun besteht aber immer noch eine Differenz zwischen der Versuchsanordnung von *Linksz* und der meinigen. *Linksz* bestimmt die Zuckerabgabe in noch kürzeren Perioden als 30 Minuten, nämlich in 8 Minuten und in 12,5 Minuten. Es wäre ja möglich, daß die erste Wirkung des Propylalkohols darin bestände, die Zuckerabgabe der Leber zu senken, daß dieser Vorgang aber durch eine nachfolgende stärkere Abgabe überkompensiert würde, so daß er bei 30 Minuten dauernden Perioden nicht zum Vorschein käme. Warum ich so

kurze Durchspülungsperioden wie 8 Minuten nicht für zweckmäßig halte, habe ich in der zweiten Mitteilung S. 165 angedeutet. Es ist außerdem, je kürzer die Periode dauert, um so schwieriger, die Durchströmungsgeschwindigkeit gleichmäßig zu gestalten. Die Leber reagiert auf den Propylalkohol regelmäßig mit einer Gefäßkontraktion, so daß man den Druck, unter dem durchströmt wird, erst erhöhen und dann wieder herabsetzen muß. Um aber jede Möglichkeit, daß an den *Linksz*schen Angaben doch etwas Richtiges sein könne, zu prüfen, habe ich die halbstündigen Perioden in einigen Versuchen noch weiter unterteilt, und zwar in Perioden von 10 Minuten. Dabei wurde die Grenze, bis zu der die Mikrozuckerbestimmung nach *Michaelis* geht, zweimal gestreift. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt die Tabelle II und die Abb. 3, 4 und 5. Ich habe die Tabelle II absichtlich in genau der Form wiedergegeben, wie sie von *Linksz* benutzt worden ist. Man erkennt, daß in allen drei Fällen, auch bei Abkürzung der Versuchsperioden auf 10 Minuten, stets bereits in den ersten 10 Minuten, in denen Propylalkohol durch die Leber läuft, eine deutliche Steigerung der Zuckerabgabe erfolgt. Sie beträgt einmal das Dreifache, einmal das Doppelte, einmal die Hälfte der Vorperiode, wie das durch die Abb. 3 bis 5 noch besonders klargestellt wird. Ich habe nunmehr alles, was möglich war, versucht, um das *Linksz*sche Resultat zu reproduzieren. Es ist mir auf keine Weise gelungen.

Tabelle II.

Dauer der Periode Min.	Durchströmungsflüssigkeit	Durchgeflossene Menge ccm	Glucose mg	p_H der Lösung	Bemerkungen
30	Barkansche Lösung	31	2,8	7,60	Abbildung 3.
20	" "	22	1,5		
10	" "	11	0,25		
10	Propylalkohol-Barkan	10	0,48		
10	Barkansche Lösung	10	3,00		
30	" "	32	6,7		
30	" "	31	1,0		
30	" "	30	2,3		
30	" "	32	3,4	7,60	Abbildung 4.
20	" "	22	1,0		
10	" "	11	0,30		
10	Propylalkohol-Barkan	9	0,96		
30	Barkansche Lösung	32	3,0	7,40	Abbildung 5.
30	" "	30,5	3,0		
10	Propylalkohol-Barkan	9,5	1,4		
10	" "	9,5	2,2		
10	Barkansche Lösung	10,0	3,6		
30	" "	30,0	7,1		
30	" "	30,5	4,5		
30	" "	30,0	3,4		

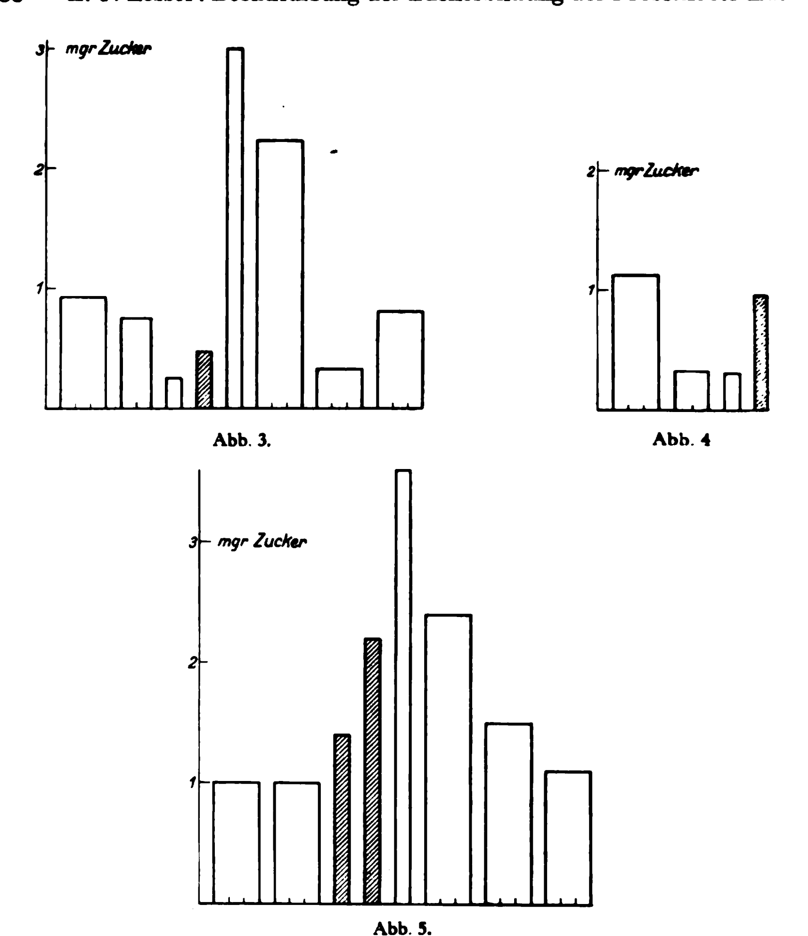


Abb. 3. Abb. 4

Abb. 5.

Die Flächen der Rechtecke stellen in Abb. 3, 4 und 5 die jeweils im ganzen bestimmten Zuckermengen dar. Die Höhen der Rechtecke stellen die in 10 Minuten abgegebenen Zuckermengen dar. Die geschwärzten Rechtecke bedeuten Perioden mit Propylalkohol-Barkanlösung.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser neuen Versuche kann daher nur ebenso lauten, wie die meiner zweiten Abhandlung:

1. Durch 10 bis 20 Minuten dauernde Durchströmung der herausgeschnittenen Froschleber in den Wintermonaten mit der von *Barkan*, *Broemser* und *Hahn* angegebenen Lösung, welche Propylalkohol in der von *Warburg* angegebenen Konzentration enthält, steigt die Zuckerabgabe — und zwar bereits in den ersten 10 Minuten — auf das Zwei- bis Sechsfache.

2. Diese Beeinflussung der Zuckerabgabe ist reversibel.

3. Sämtliche diesbezüglichen Angaben von *Artur Linksz*[1]) sind falsch.

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **204**, 572, 1924; **211**, 335, 1926.

Untersuchungen über Cholesterin- und Lecithinsuspensionen.

Von

P. Rona und **W. Deutsch.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität, Berlin.)

(Eingegangen am 17. Februar 1926.)

Bei der großen Bedeutung, die das Cholesterin und Lecithin im Organismus einnehmen, erscheint es nicht überflüssig, trotz der großen Zahl vorliegender Untersuchungen das Thema über Lecithin- und Cholesterinsuspensionen erneut in Angriff zu nehmen.

Methodik.

Herstellung der Cholesterinsuspensionen in Anlehnung an Porges und Neubauer.

Porges und *Neubauer* trugen in Aceton gelöstes Cholesterin in kleinen Portionen in Wasser ein, nachdem jedesmal vor dem Zulassen einer neuen Portion das Aceton im Becherglas auf dem Wasserbad bei gelinder Wärme vertrieben war.

Wir verfuhren folgendermaßen: Cholesterin (*Kahlbaum*), etwa 0,4 g in 40 ccm Aceton (aus der Bisulfitverbindung) gelöst, befanden sich in einem Scheidetrichter. In eine Saugflasche mit 200 ccm Leitfähigkeitswasser, die in einem Wasserbad von etwa 60 bis 70° C hing, führten durch einen Gummistopfen das Rohr des Scheidetrichters, das so hoch über der Flüssigkeitsoberfläche endete, daß es durch heftiges Aufwirbeln derselben nicht benetzt wurde, und gleichzeitig ein Glasrohr bis zum Boden der Saugflasche. Mit der Wasserstrahlpumpe wurde nun dauernd Luft durch das Wasser gesogen, die es so heftig aufwirbelte, daß sich die in Abständen von etwa 5 Minuten zugelassenen Mengen der Cholesterinlösung (jedesmal etwa 1 ccm) sofort verteilten. Die angesogene Luft passierte ein Blättchen angefeuchtetes Filtrierpapier, das sich gegen die äußere Mündung des Luftrohres preßte. Nachdem die Cholesterinsuspension die gewünschte Dichtigkeit erreicht hatte und das Aceton vollständig vertrieben war, wurde sie filtriert. Da sich während der Herstellung der Suspension ein Teil des Cholesterins nicht kolloidal verteilt, sondern in gröberen Flocken abscheidet, wurde eine quantitative Bestimmung des in den Versuchen als Endkonzentration vorhandenen Cholesterins nach *Autenrieth* vorgenommen. Er betrug nach der Verdünnung der jeweiligen Stammsuspension von 1 bis 2 ccm auf 10 ccm 0,008 bis 0,01 g-Proz. Die Einstellung auf die gleiche Konzentration innerhalb verschiedener Versuche geschah

durch Vergleich des Trübungsgrades der verschiedenen Suspensionen in Reagenzgläsern gleichen Durchmessers. Die Cholesterinstammlösung wurde nicht länger als 6 Tage benutzt, obwohl sie nach 4 Wochen äußerlich keine Veränderung zeigte, bis auf einen feinsten Anflug von Bodensatz, der immerhin auf eine gewisse, ganz allmähliche Dispersitätsvergröberung schließen läßt.

Herstellung der Lecithinsuspensionen.

Im Prinzip war es das gleiche Verfahren wie beim Cholesterin. Etwa 4 g reinsten Lecithins ex ovo (*Merck*) wurden in etwa 40 ccm reinsten redestillierten Äthers gelöst. Langsames Zugeben zum Wasser (200 ccm) erübrigt sich. Unter starkem Umschwenken der Saugflasche wurde in drei Portionen die ätherische Lecithinlösung zugegossen und dann ohne Erwärmung mit der Saugpumpe Luft durchgesogen, bis der Äther vollständig verdunstet war. Die endgültige Lecithinkonzentration nach Verdünnung der Stammlösung (1 bis 2 ccm) auf 10 ccm wurde einmal quantitativ nephelometrisch als P_2O_5 nach Veraschung bestimmt und in den übrigen Versuchen durch Vergleich des Trübungsgrades in gleichen Reagenzgläsern wieder eingestellt. Sie betrug immer 0,4 g-Proz., wenn nicht anders angegeben ist. Die Lecithinstammlösung wurde nicht länger als 3 bis 4 Tage benutzt, weil sich dann zuweilen Flocken abscheiden. Ihre Haltbarkeit ist geringer als die der Cholesterinsuspension.

Versuchsmethodik.

Bei allen Versuchen kamen reinste Chemikalien (*Kahlbaum*) und für sämtliche Vorratslösungen sowie für Verdünnung Leitfähigkeitswasser zur Verwendung. Überhaupt mußte bei der Empfindlichkeit der reinen Cholesterinsuspensionen auf peinlichste Sauberkeit geachtet werden, z. B. wurde streng vermieden, die gereinigten Reagenzgläser an ihrem Rande zu berühren.

Um beim Ansetzen der Versuchsreihen eine gleichmäßige Art der Durchmischung und Zusatzgeschwindigkeit zu erzielen, wurden in eine Reihe von Reagenzgläsern die Salzlösungen bzw. Puffergemische + Salzlösungen pipettiert, in eine zweite Reihe korrespondierend die Suspension + dem dazugehörigen Verdünnungswasser. Dann wurde die Salzlösung durch schnelles Zusammengießen mit der Suspension und zweimaliges Hin- und Hergießen gründlich vermischt. (Endvolumen in jedem Röhrchen bei allen Versuchen 10 ccm.)

Sämtliche Puffergemische kamen in $^1/_{100}$ Normalität zur Anwendung. Die Abstufung des übrigen Salzgehalts erfolgte im allgemeinen als geometrische Reihe mit dem Quotienten 2.

p_H-Messung. Alle p_H-Messungen wurden elektrometrisch ausgeführt. An Cholesterinlösungen in U-Elektroden, weil Chinhydronmessung ungenaue Werte ergibt, bei Lecithin zuweilen auch mit Chinhydron. Das endgültige Potential bei Benutzung der U-Elektroden für Cholesterin stellt sich zuweilen erst nach 1 bis $1\frac{1}{2}$ Stunden ein und schwankt häufig um $\pm$ 2 Millivolt. Den Chinhydronmessungen wurde der erste Wert direkt nach dem Vermischen zugrunde gelegt. Die Messungen einiger Versuchsreihen mit ungepufferten Lösungen und sehr geringem Salzgehalt wurden zur Erhöhung der Leitfähigkeit unter Zugabe von geringen Mengen NaCl ausgeführt.

Registrierung der Flockung.

In allen Fällen, in denen die Flockung langsam einsetzte, wurde die Ablesung bei Tageslicht gegen ein helles Fenster, bei Lampenlicht gegen zwischengeschaltete Mattglasscheibe mit Lupe (12mal. Vergrößerung) vorgenommen, um den Beginn der Flockung zu erfassen, weil sich mit ihrem Fortschreiten zuweilen die feineren Unterschiede verwischen. Je nach der Geschwindigkeit der Flockung erfolgte ihre Ablesung in kürzeren (5 bis 10 Minuten) oder längeren (½ bis 1 Stunde) Abständen und wurde über mehrere Stunden verfolgt. Außerdem wurde das Endergebnis am nächsten Tage registriert, wobei sich die Grenzkonzentrationen oft schärfer abheben.

In den folgenden Tabellen bedeuten:

Sp = Spur
vst = vollständig
vst - = vollständig minus

d. h. die Flockung hatte sich großenteils abgesetzt. Je nach dem Grade des Absetzens sind Minuszeichen angefügt.

I. H-Ionenflockung bei Cholesterin.

Zur Feststellung der Flockung durch H-Ionen wurden einerseits Reihen mit Na-Lactat- und Na-Tartratpuffern von abgestuftem p_H (Differenz etwa 0,3 p_H), andererseits Reihen mit abgestuftem HCl-Gehalt ohne Puffer angesetzt. Dabei zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite zwischen verschiedenen sonst praktisch gleichartig hergestellten Cholesterinsuspensionen. Die Flockungsgrenze zwischen stabil bleibender und flockender Suspension war unabhängig von der Art des zugesetzten Puffers und lag zwischen p_H 2,4 und 3,2, während sie für die HCl-Flockung um p_H 2,4 liegt, wegen der fehlenden additiven Wirkung der Na-Ionen. Einer kürzlich erschienenen Angabe von *R. Stern*[1]) zufolge soll der Grenzwert bei $p_H = 5{,}0$ liegen. Ob diese Differenz gegen unsere Ergebnisse durch seine andere Herstellungsart der Suspension oder durch höheren Elektrolytgehalt der verwandten Pufferlösung (Molarität ist nicht angegeben) veranlaßt ist, bleibt dahingestellt.

Tabelle I.

„Milchsäureflockung". Reihe angesetzt um 11 Uhr 25 Minuten.

Natriumlactat, m/10	1	1	1	1	1	1	1
Milchsäure, m/1	1,6	0,8	0,4	0,2			
„ m/10					1	0,5	0,25
Cholesterinsuspension	2	2	2	2	2	2	2
Aqua dest.	5,4	6,2	6,6	6,8	6,0	6,5	6,75
Flockungsgrad um 12h00'	×××	0	0	0	0	0	0
„ 1 45	×××××	××	0	0	0	0	0
„ 4 15	vst	×××××	0	0	0	0	0
12. XII. 1925 um 9 30	vst	vst	××	0	0	0	0
p_H gemessen	—	2,87	3,09	3,55	—	—	—

[1]) *R. Stern*, Klin. Wochenschr., 4. Jahrg., 1925, S. 1650.

Tabelle II. „Salzsäureflockung". Reihe angesetzt um 2 Uhr 10 Minuten.

	1	2	3	4	5
HCl, m/100	8,2	6,4	4,6	2,8	1
Cholesterinsuspension	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Aqua dest.	0	1,6	3,4	5,2	7,0
Flockungsgrad 20. XII. um 4h30′	×××××	××	Sp	0	0
„ 21. XII. um 9h30′	vst	vst	vst	0	0
p_H gemessen	—	2,21	2,47	2,54	—

II. Flockung durch Salze bei Cholesterin.

Nachdem die Flockungsgrenze für H-Ionen festgestellt war, wurde zunächst der Einfluß von Salzen mit verschiedenem Kation aber gleichem Anion (Cl) bei einem p_H untersucht, der sich zwar möglichst nahe an der Flockungsgrenze aber mehr im alkalischen Gebiet befand. p_H wurde variiert. Die große Abhängigkeit vom p_H zeigen folgende Versuchsergebnisse.

Tabelle III. Versuch 15. 31. Juli 1925. „Soll" p_H 2,4. „NaCl".

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Endkonzentr. an NaCl	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	0	0
Na-Tartrat, m/10	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Weinsäure, m/1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0
NaCl, m/1	5	2,5	1,25	0,625					
NaCl, m/10					3,13	1,56	0,78	0	0
Cholesterinsusp.	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Leitf.-Wasser	1,6	4,1	5,35	5,98	3,47	5,04	5,82	6,6	8
Reihe angesetzt um 12h.									
Flockungsgrad um 1h05′	××	××	×	×	×	Sp	0	0	0
„ 1 30	×××	×××	××	×	×	×	×	±	0
„ 4 30	×××××	×××	×××	×××	×××	××	××	±	0
1. VII. um 9h30′	vst	vst	vst	vst	vst-	vst--	××	×	0
p_H gemessen	—	2,23	—	2,40	—	2,57	—	2,59	—

Das Kontrollröhrchen 8 zeigt nur ganz geringe Flockung. Die Grenzkonzentration liegt bei m/64 bis m/128.

Tabelle IV. Versuch 14. „NaCl". Anordnung wie Versuch 15, nur bei „Soll p_H" 3,0. Reihe angesetzt um 3 Uhr 25 Minuten mit der gleichen Suspension wie Versuch 15.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Endkonzentr. an NaCl	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	0
Flockungsgrad								
30. VII. um 4h55′	×××	×××	××	×	0	0	0	0
„ 5 10	××××	××××	××	×	0	0	0	0
„ 5 30	×××××	×××××	×××	×	0	0	0	0
31. VII. um 9h30′	vst	vst	vst	vst-	0	0	0	0
p_H gemessen	—	2,47	—	—	—	3,02	—	—

Das Kontrollröhrchen 8 hat nicht geflockt.

An diesen Beispielen zeigt sich, daß die Flockungsgrenzkonzentration des Neutralsalzes beim Übergang vom etwa p_H 2,5 auf etwa p_H 3,0 ansteigt von m/128 auf m/16 bis m/32. Da aber bei der angewandten Konzentration des Puffers von $^1/_{100}$ Molarität die höheren Konzentrationen an Neutralsalz von etwa m/16 bis m/2 eine zunehmende Verschiebung des p_H ins Saure bewirken infolge der Vergrößerung der Dissoziationskonstante der Puffersäure, fanden diese Versuche bei nicht ganz streng konstantem p_H statt, so daß ein Teil der Wirkung bei den höheren Konzentrationen auf Rechnung der H-Ionen kommt. Eine diesen Umstand berücksichtigende Anwendung von Puffern mit abgestuftem p_H ändert an dem Ergebnis der festgestellten Grenzkonzentration von m/64 bis m/128 für p_H 2,5 nichts, da bei ihr die Verschiebung nach der sauren Seite zu gering ist.

Versuchsbeispiel für Konstanthaltung des p_H durch abgestufte Puffergemische.

Tabelle V.

Versuch 20. 5. August 1925.

Durchschnitts-„Soll p_H“ 2,4. „NaCl“.

		1	2	3	4	5	6	7	8
Weinsaures Puffergem. p_H	2,7	1,2	1,2						
	2,6			1,3	1,3				
	2,5					1,3			
	2,4						1,4	1,4	1,4
NaCl, m/1		5	2,5	1,25	0,625				0
NaCl, m/10						3,13	1,56	0,78	0
Cholesterinsuspens. Aqua dest.		1,8	4,3	5,5	6,1	3,6	5,1	5,8	6,6

Reihe angesetzt um 3 Uhr 5 Minuten.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Endkonzentration an NaCl							
	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	0
Flockungsgrad um 3h45′	××	××	×	×	×	×	0	0
Flockungsgrad um 4 15	××××	××××	×××	××	××	×	Sp	0
Flockungsgrad um 4 30	××××	××××	×××	×××	×××	××	×	Sp
Flockungsgrad um 5 30	×××××	×××××	××××	××××	××××	×××	××	×
p_H gem.	2,52	2,55	2,55	2,59	2,50	2,42	2,47	2,47

Prinzipiell gleich verhalten sich die übrigen untersuchten Alkalien KCl (mit Lactatpuffer untersucht), NH_4Cl, LiCl, CsCl und RbCl. Wenn sich eine Suspension etwas empfindlicher zeigte, so daß also schon die nur Puffer enthaltende Kontrolle stärker flockte, dann wurde mit dem „Soll p_H“ etwas mehr ins Alkalische gerückt.

Für die Erdalkalien $BaCl_2$ und $CaCl_2$ ergab sich eine wesentlich tiefer liegende Grenzkonzentration von etwa m/2048 bis m/4096, entsprechend der höheren Wertigkeit des Kations.

Wenden wir uns nun der Untersuchung dreiwertiger Kationen, wie Al- und Cero-Ionen, zu, so ergibt sich wiederum eine noch tiefer liegende Grenzkonzentration als bei den Erdalkalien bis herunter zu etwa m/150000.

Aber der absolute Wert ist wegen des Auftretens der Erscheinung der unregelmäßigen Reihen und der hierbei stärker ins Gewicht fallenden, etwas differenten Stabilität verschiedener Cholesterinsuspensionen schwieriger anzugeben. Fällt nämlich ein Flockungsminimum gerade zwischen zwei Glieder der Reihe, so ist man sich im Unklaren, ob die Zone der Anionen- oder Kationenflockung vorliegt. Stuft man aber die Reihen mit einem feineren Quotienten, etwa 1,5, ab, so gestalten sich die Versuche dadurch schwieriger, daß die an sich feineren Differenzen zwischen den einzelnen Gliedern schneller durch das Fortschreiten der Flockung verwischt werden.

Als Beispiel sei der zeitliche Verlauf des Flockungsgrades eines Versuchs mit $AlCl_3$ bei p_H 3,2 wiedergegeben. Quotient der Reihe 1,5.

Tabelle VI.

Reihe angesetzt um 2 Uhr. „$AlCl_3$". „Soll p_H 3,2".

	m/2592	m/3888	m/5822	m/8748	m/13122
Um 3h00'	××××	××××	××	×	Sp
„ 5 00	vst	vst – –	×××××	××××	Sp
p_H gem.				2,90	

	m/19683	m/29525	m/44287	m/66430	m/99645	m/149467
Um 3h00'	±	0	0	0	0	0
„ 5 00	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	0
p_H gem.			2,90			

Prinzipiell gleich verhält sich Cerochlorid.

Dieselbe Art von Versuchen wurde nun für p_H 5,0 und ohne Pufferzusatz durchgeführt.

Tabelle VII.

Versuch 39. Beispiel: „NaCl". „Soll p_H" 5,0.

Reihe angesetzt um 1 Uhr 45 Minuten.

	m/2	m/4	m/8	m/16
6. X. um 2h45' . .	×××	×	Sp	0
„ 3 20 . .		kaum verändert		
„ 3 50 . .	××××	×××	×	0
„ 4 45 . .	×××××	××××	×+	0
7. X. um 9h30' . .	vst	vst –	vst – – –	0

Bei dieser Abstufung der Reihe (Quotient 2) verhielten sich die Alkalien völlig gleich, erst bei kleiner gewähltem Quotienten (1,2) kamen geringe Unterschiede zwischen Na˙, K˙, $NH_4^{\cdot}$ und Li˙ zum Vorschein, die aber fast in der Fehlerbreite der Versuche liegen.

Tabelle VIII.

8. Oktober 1925. Reihen angesetzt um 1 Uhr. „Soll p_H" 5,0.
Flockung um 4 Uhr 45 Minuten.

	m/8	m/9,6	m/11,5	m/13,81	m/16,6
NaCl . .	Sp	0	0	0	0
KCl . .	Sp	0	0	0	0
NH_4Cl .	×	Sp +	Sp	0	0
LiCl . .	Sp	Sp	0	0	0

9. Oktober 1925.
Flockung um 9 Uhr 30 Minuten.

	m/8	m/9,6	m/11,5	m/13,81	m16,/6
Na . . .	××××	Sp +	Sp	0	0
KCl . .	××××	×	Sp +	Sp	0
NH_4Cl .	vst –	vst – –	××	×	±
LiCl . .	vst – –	vst – – –	×+	×	0

NH_4 und Li˙ waren also um ein Geringes wirksamer.

p_H-Messung: m/9,6 NaCl . . . . . p_H 4,8
m/11,5 KCl . . . . . . p_H 4,86
m/13,81 NH_4Cl . . . . p_H 4,86
m/13,81 LiCl. . . . . . p_H 4,83

Gegenüber den Versuchen mit den Alkalien bei etwa p_H 3,4 ist ein Hinaufrücken der flockenden Salzkonzentration von m/64 bis m/128 auf etwa m/8 bis m/16 festzustellen. Derselben Erscheinung begegnet man auch bei den folgenden Versuchen mit dreiwertigem Kation und eine weitere Verschiebung um ein Geringes bei den Versuchen ohne Puffer.

Für $BaCl_2$ und $CaCl_2$ ist die Grenzkonzentration bei p_H 5,0 m/256 bis m/512, ohne Puffer p_H etwa 6,7 m/128 bis m/256.

Der Verlauf der Versuche mit dreiwertigem Kation sei am Beispiel des $AlCl_3$ wiedergegeben, wegen des differenten Verhaltens der unregelmäßigen Reihe.

„Soll p_H" 5,0. „$AlCl_3$". (Versuch

	1	2	3	4	5	6	
	m/512	m/768	m/1152	m/1728	m/2592	m/3888	
Flockungsgrad 18. XII. 2h00′	××	×	Sp	×	××	××+	×
2 30	×××	××	×	×××	××××	×××××	××
3 10	××××+	××××	××+	×××××	××××××	vst —	v
19. XII. 9h30′	vst	vst	vst	vst	vst	vst	
p_H gemessen	4,8	—	—	4,94	—	—	

Derselbe Versuch ohne Puffer zeigt folgenden

	1	2	3	4	5	6	
Flockungsgrad 4h10′	×+	×	Sp	0	0	0	
19. XII.	××××+	××××	Sp +	0	0	0	
p_H gemessen	3,60	—	—	—	3,98	—	

Zunächst fällt beim Vergleich beider Versuche auf, daß der Versuch mit Puffer wesentlich schneller flockt als der ohne Puffer. Ferner zeigt die Erscheinung der unregelmäßigen Reihe Besonderheiten. Die untere Flockungsgrenze ist auch hier, wie schon oben allgemein erwähnt, mit m/29525 bis m/44287 im Versuch ohne Puffer gegenüber m/44287 bis m/66450 im Versuch mit Puffer hinaufgerückt. Die Zone geringster Stabilität, d. h. stärkster Erniedrigung des kritischen Potentials, liegt beim Pufferversuch von m/8748 bis m/13122, im anderen von m/19683 bis m/29525, also tiefer. Zu beiden Seiten des oben erwähnten Gebietes der maximalen Flockung erstreckt sich die Zone des kritischen Potentials. Während nun im Pufferversuch die Um- und Aufladung des Sols durch die Aluminiumionen nicht mehr zu vollständiger Stabilisierung desselben führt, sondern die Flockung über ein Minimum bei m/1152 fließend in die Cl-Ionen-Flockung übergeht, finden wir im Versuch ohne Puffer eine breite Zone völliger Stabilität (m/1728 bis m/6748) auf Kosten der hier stark verschmälerten Zone zwischen den kritischen Potentialen (m/13122 bis m/29525). Der Übergang in die Cl-Ionenflockung findet an derselben Stelle (m/1152) statt wie im Pufferversuch. Die Flockung ist aber viel schwächer als dort.

Überblicken wir noch einmal zusammengefaßt die Versuchsresultate, so ergibt sich:

1. Eine große Empfindlichkeit des hydrophilen Cholesterinsols gegen H-Ionen. Flockungsgrenze p_H 2,4 bis 3,2 bei m/100 Puffergemisch. Nach der alkalischen Seite der angegebenen Grenze besteht Stabilität, nach der sauren Seite zunehmende Flockung.

2. Je höher die Wertigkeit des flockenden Kations ist, eine um so geringere Konzentration genügt zur Flockung.

angesetzt um 12 Uhr 30 Minuten. Quotient der Reihe = 1,5.

8	9	10	11	12	13	14	15	16
748	m/13122	m/19683	m/29525	m/44287	m/66430	m/99645	m/149467	m/224201
××	×××	××+	×+	Sp	0	0	0	0
×××	××××××	××××	××+	Sp	0	0	0	0
st	vst	vst – – –	×××××	Sp	0	0	0	0
st	vst	vst	vst	××	0	0	0	0
–	—	5,01	—	—	—	—	—	—
angesesetzt um 12 Uhr 40 Minuten.								
0	××	××××	××××	0	0	0	0	0
0	vst – – –	vst	vst	0	0	0	0	0
–	6,00	—	—	6,24	—	—	—	—

3. H˙-Ionen und die jeweilig angewandten Kationen addieren sich in ihrer Wirkung.

Tabelle X.

Flockungsgrenzkonzentrationen für Salze verschiedener Wertigkeit.

	1 wertiges Kation	2 wertiges Kation	3 wertiges Kation
Mit Puffer p_H 2,7—3,2	m/16—m/32	m/2048—m/4086	m/150 000
Mit Puffer p_H 5,0	m/8 —m/16	m/256 —m/512	m/44 287—m/66 450
Ohne Puffer p_H 6,5	m/8 —m/16	m/128 —m/256	m/29 525—m/44 287

III. Versuche an Lecithinsuspensionen.

Allgemeine Bemerkungen zur Lecithinflockung. In weit höherem Maße als bei Cholesterin machen sich beim Ansetzen der Reihen mit Lecithin die Zonen späterer Flockung bzw. Dispersitätsveränderungen, die auch nach langer Zeit noch nicht zur Flockung führen, durch starke Trübung kenntlich. Wenn im folgenden von Flockungsgrenzkonzentration gesprochen wird, sind nur solche Röhrchen gemeint, in denen wirklich Flockenbildung eintrat.

Flockung durch H-Ionen.

Die Versuchsmethodik schließt sich in allen Einzelheiten an die beim Cholesterin befolgte an, so daß die Angabe der Resultate genügt. Es ergeben sich keine Unterschiede, wenn die Flockung durch HCl oder Tartratpuffer hervorgerufen wird. Dieses Resultat ist bei dem viel hydrophileren Verhalten des Lecithins nicht verwunderlich. Der geringe Gehalt an Na-Tartrat (m/100) fällt nicht ins Gewicht. Das *von uns benutzte* Lecithinpräparat zeigte eine Flockungsgrenze bei p_H 1,73 bis 1,75.

Flockung durch Salze bei Lecithin.

Auf Grund der Versuche über H-Ionenflockung wurde zunächst ein p_H gewählt, das in der Nähe der Flockungsgrenze, aber etwas mehr im Alkalischen lag, und zwar p_H 2,0 bis 2,2.

Die Flockung verläuft bei den Alkalien völlig gleich, aber viel langsamer als beim Cholesterin. Sie setzt erst etwa 20 Stunden nach dem Ansetzen des Versuchs ein.

Tabelle XI.

Beispiel: „NaCl". Reihe angesetzt um 2 Uhr 30 Minuten.
„Soll p_H" = 2,0 durch Tartratpuffer.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Endkonzentration an NaCl	2,5 m	2 m	m/1	m/2	m/4	m/8	m/16	0
Flockungsgrad								
23. X. um 5h00' .	0	0	0	0	0	0	0	0
24. X. „ 9 30 .	0	0	0	×	××	0	0	0
„ 1 35 .	0	0	××	×××	×××	××	0	0
p_H gem. (Chinhydr.)	1,85	1,92	2,01	2,09	2,23	2,29	2,31	2,30

Das Flockungsoptimum liegt also bei m/2 bis m/4.

Für $BaCl_2$ und $CaCl_2$ ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle XII.

Reihen angesetzt um 3 Uhr. „Soll p_H" 2,0 (Tartratpuffer).
„$BaCl_2$" und „$CaCl_2$".

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Endkonz. an Salz	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	
Flockungsgrad											
26. X. 3h30'	0	0	0	0	×	0	0	0	0	0	„$BaCl_2$"
5 00	0	0	0	××	×××	Sp	0	0	0	0	
27. X. 9 30	0	×××	×××	×××	×××	××	0	0	0	0	
p_H gemessen (Chinhydr.)	1,83	1,97	2,12	2,22	2,29	2,37	2,43	—	—	—	
Flockungsgrad											
26. X. 3h30'	0	0	0	0	×	×	0	0	0	0	„$CaCl_2$"
5 00	0	0	0	Sp	×××	×××	0	0	0	0	
27. X. 9 30	0	×××	×××	×××	×××	×××	××	0	0	0	
p_H gemessen (Chinhydr.)	—	1,88	2,03	2,18	2,32	2,42	2,51	2,55	—	—	

Gegenüber den Alkalien sind die Hauptunterschiede die bedeutend schnellere Flockung (Beginn 30 Minuten nach dem Ansetzen) und das tiefer liegende Optimum, das bei $BaCl_2$ bei m/32, bei $CaCl_2$ etwas breiter, bei m/32 bis m/64 liegt, wie überhaupt $CaCl_2$ an Wirksamkeit $BaCl_2$ etwas übertrifft, denn am nächsten Tage reicht die $CaCl_2$-Flockung bis m/128, $BaCl_2$ aber nur bis m/64.

Aluminiumchlorid mit Cerochlorid. „Soll p_H“ 2,2 (Tartratpuffer). Reihe angesetzt um 11 Uhr 50 Minuten. „$AlCl_3$“.

Endkonzentr. an $AlCl_3$	m/2,86	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	m/8192	m/16 384	m/32 768
Flockungsgrad															
27. X. um 11h50'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	0	0	0	0
„ 12 55	×	Sp	0	0	0	0	0	0	0	vst	vst	0	0	0	0
„ 1 10	××+	Sp+	0	0	0	0	0	0	0	vst	vst	0	0	0	0
„ 1 50	vst--	×××	0	0	0	0	0	0	0	vst	vst	Sp+	0	0	0
„ 5 35	vst	vst	×	0	0	0	0	0	0	vst	vst	vst-	0	0	0
28. X. „ 9 30	vst	vst	vst	0	0	0	0	0	0	vst	vst	vst	0	0	0
p_H gem. (Chinhydr.)	—	—	1,64	—	—	—	2,17	—	—	2,42	2,44	2,46	—	—	—

Tabelle XIV. „Soll p_H“ 2,2 (Tartratpuffer). Reihe angesetzt um 4 Uhr 40 Minuten. „$CeCl_3$“.

Endkonzentr. an $CeCl_3$	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	m/8192	m/16384	m/32768
Flockungsgrad															
27. X. um 4h45'	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp	0	0	0	0	0	0
„ 5 10	0	0	0	0	0	0	0	0	×××	×	0	0	0	0	0
„ 5 35	0	0	0	0	0	0	0	0	vst-	×××	0	0	0	0	0
27. X. „ 9 30	vst	vst	Sp	0	0	0	0	×××	vst	vst	0	0	0	0	0
p_H gem. (Chinhydr.)	—	1,34	—	—	—	—	2,12	2,29	2,39	—	—	—	—	—	—

Tabelle XV. Reihen angesetzt um 1 Uhr 20 Minuten. „Soll p_H“ 5,0 (Acetatpuffer). „$BaCl_2$“ und „$CaCl_2$“.

Endkonzentration an Salz	0,8 m	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	
Flockungsgrad											
29. X. um 1h35'	0	0	0	0	Sp	0	0	0	0	0	„$BaCl_2$“
„ 2 05	0	0	0	0	×	Sp	0	0	0	0	
„ 4 15	0	0	0	××	×××	××	0	0	0	0	
30. X. „ 9 30	0	0	×××	vst	vst	vst	0	0	0	0	
p_H gem. (Chinhydron)	—	4,14	4,51	4,63	4,81	4,94	5,07	—	—	—	
Flockungsgrad											
29. X. um 1h35'	0	0	0	0	0	Sp	0	0	0	0	„$CaCl_2$“
„ 2 05	0	0	0	0	0	××	Sp	0	0	0	
„ 4 15	0	0	0	×	××××	×××××	××	0	0	0	
30. X. „ 9 30	0	0	×××	vst	vst	vst	vst--	0	0	0	
p_H gem. (Chinhydron)	—	4,16	4,43	4,61	4,78	4,94	5,12	—	—	—	

Aluminium und Cer verhalten sich prinzipiell gleich. Cer ist etwas schwächer wirksam. Die Flockung geht in der optimalen Zone noch viel schneller als bei den Erdalkalien (5 Minuten nach dem Ansetzen). Außerdem haben sie zwei Zonen, 1) von m/2 bis m/8 und 2) bei Aluminium m/1024 bis m/4096, bei Cer m/256 bis m/1024. Der Charakter der Flockung ist in diesen beiden Zonen verschieden. Während sich die Suspension in der weniger konzentrierten Zone schnell absetzt und die überstehende Flüssigkeit fast wasserklar ist, geht die Flockung im konzentrierteren Gebiet viel langsamer vor sich und hinterläßt eine trübere, überstehende Flüssigkeit.

Die p_H-Messungen zeigen, daß die Pufferung bei höheren Salzkonzentrationen nach der saueren Seite durchbrochen ist, so daß die Wasserstoffzahl schon oberhalb der Flockungsgrenzkonzentration für H-Ionen liegt. Daß die Flockung diesem Umstand allein aber nicht zuzuschreiben ist, beweisen die späteren Versuche bei alkalischerem p_H, die ebenfalls in der Zone m/2 bis m/8 Flockung zeigen.

Salzflockung an Lecithin bei p_H 5,0.

Die untersuchten Alkalien NaCl, RbCl, NH_4Cl und LiCl flocken sämtlich auch nach 5 Tagen nicht.

Bei den Erdalkalien $BaCl_2$ und $CaCl_2$ begegnen wir fast dem gleichen Verhalten wie bei p_H 2,0. (Tabelle XV.)

Auch $AlCl_3$ und $CeCl_3$ zeigen nur geringe Verschiebungen. (Tabelle XVI und XVII.)

Salzflockung an Lecithin ohne Pufferzusatz.

Außer LiCl, das nach 4 Tagen geringe Flockung (m/1 Sp., m/2 ×) zeigte, flockten die übrigen Alkalien gar nicht.

Die Erdalkalien zeigen wieder das gleiche Verhalten, wie bei p_H 5,0 (mit Puffer). (Tabelle XVIII.)

Bei $AlCl_3$ und $CeCl_3$ ist außer geringer Verschiebung des Optimums nach rechts nur hervorzuheben, daß die Flockung erheblich schneller verläuft. Im Optimum setzt sie *momentan* ein, während sie bei den Versuchen mit Puffer erst nach 5 Minuten begann. (Tabelle XIX.)

Der Versuch mit $CeCl_3$ verläuft völlig gleich.

Zusammengestellt ergeben die Versuche mit Salzen an Lecithin Tabelle XX.

Im ganzen betrachtet, erweisen sich also die Alkalien als recht unwirksam. Nur bei p_H 2,0 wirkten sie fällend. Bedeutend stärker flockten $BaCl_2$ und $CaCl_2$, was sich sowohl in der geringeren optimalen Konzentration wie in der Zeit bis zum Flockungsbeginn ausspricht

Tabelle XVI. Reihe angesetzt um 3 Uhr 30 Minuten. „Soll p_H" 5,0 (Acetatpuffer). „$AlCl_3$".

Endkonzentration an Salz	m/2,86	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	m/8192	m/16 384	m/32 768
Flockungsgrad 29. X. um 3h35'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp	0	0	0	0
„ 4 20	××	×	0	0	0	0	0	0	0	0	××××××	0	0	0	0
30. X. „ 9 30	vst	vst	0	0	0	0	0	0	0	0	vst	0	0	0	0
p_H gem. (Chinhydron)	—	2,7	3,02	—	—	—	4,23	—	—	5,19	5,36	5,44	—	—	—

Tabelle XVII. Reihe angesetzt um 4 Uhr 45 Minuten. „Soll p_H" 5,0 (Acetatpuffer). „$CeCl_3$".

Endkonzentr. an $CeCl_3$	m/2,86	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	m/8192	m/16 384	m/38 768
Flockungsgrad 5. XI. um 4h57'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp	×	0	0	0
6. XI. „ 9 30	vst	vst	0	0	0	0	0	0	0	0	vst	vst	0	0	0
p_H gem. (Chinhydron)	—	3,43	—	—	—	—	4,68	—	—	—	5,03	—	—	—	—

Tabelle XVIII. Reihe angesetzt um 2 Uhr 20 Minuten. Kein Pufferszuatz. 1. „$BaCl_2$", „2. $CaCl_2$".

Endkonzentration an Salz	0,8 m	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256
Flockungsgrad 30. X. um 2h30'	0	0	0	0	Sp	Sp	0	0	0 } $BaCl_2$
„ 3 35	0	0	0	Sp	×	×	0	0	0
„ 5 14	0	0	0	××	××	××	0	0	0
31. X. „ 9 30	0	0	vst	vst	vst	vst	0	0	0
p_H gemessen (Chinhydron)	—	3,54	3,71	3,77	3,95	3,98	4,22	4,34	—
Flockungsgrad 30. X. um 2h30'	0	0	0	0	0	×	×	0	0 } $CaCl_2$
„ 3 35	0	0	0	0	×	××	×××	0	0
„ 5 14	0	0	0	×	××	×××	××××	0	0
31. X. „ 9 30	0	Sp	vst	vst	vst	vst	vst	±	0
p_H gemessen (Chinhydron)	—	3,37	3,68	3,82	3,99	4,18	4,26	4,23	—

Tabelle XIX.

Reihe angesetzt um 5 Uhr 5 Minuten.

Endkonzentration an $AlCl_3$	m/2,86	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	m/8192	m/16384
Flockungsgrad												Fl.-B. momentan	fast momentan	
30. X. 5h10′	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	××	×	0
31. X. 9h30′	vst	vst	0	0	0	0	0	0	0	0	0	vst	vst	0
p_H gemessen (Chinhydr.)	2,53	2,65	2,89	—	—	—	3,66	—	—	—	4,17	4,17	4,21	4,28

Tabelle XX.

p_H 2,0	p_H 5,0	Ohne Puffer
NaCl, KCl, NH_4Cl, LiCl: Optimum m/2–m/4 Fl.-B. n. 20h	Keine Flockung während 5 T.	Ganz geringe Flockung bei Li m/1–m/3 nach 3 T.
$BaCl_2$ Opt. m/32 } Fl.-B. m/4–m/64 } a. n. $CaCl_2$ „ m/32–m/64 } n. 10′ m/4–m/128 } T.	m/16 } Fl.-B. m/4–m/32 } a. n. m/32 } n. 10′ m/4–m/64 } T.	m/16–m/32 } Fl.-B. m/4–m/32 } a. n m/32–m/64 } n. 10′ m/4–m/64 } T.
Flockungszone: obere / untere	Flockungszone: obere / untere	Flockungszone: obere / untere
$AlCl_3$ obere: m/2,86–m/8 a. n. T. untere: m/1024–m/2048 n. 5′ m/1024–m/4096 a. n. T.	obere: m/2,86–m/4 a. n. T. untere: m/2048 n. 5′ m/2048 a. n. T.	obere: m/2,86–m/4 a. n. T. untere: m/4096–m/8192 momentan ebenso a. n. T.
$CaCl_2$ obere: m/2–m/8. a. n. T. untere: m/512 –m/1024 n. 5′ m/256 –m/1024 a. n. T.	obere: m/2,86–m/4 a. n. T. untere: m/2048–m/4096 n. 5′ m/2048–m/4096 a. n. T.	obere: m/2,86–m/4 a. n. T untere: m/4096–m/8192 momentan ebenso a. n. T.

Fl.-B. = Flockungsbeginn. a. n. T. = am nächsten Tage.

und noch stärker $AlCl_3$ und $CeCl_3$, bei denen zwei Zonen auftreten. p_H-Unterschiede sind von wesentlich geringerer Bedeutung als beim Cholesterin.

IV. Versuche mit Salzgemischen an Cholesterin bei „Soll p_H" 3,0 und 5,0.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß zu einer abgestuften NaCl-Reihe zunächst wieder bei p_H 3,0 eine etwas unterhalb der Grenzkonzentration bleibende konstante $CaCl_2$-Menge gegeben wurde. Nebenbei liefen Kontrollen 1. mit NaCl ohne $CaCl_2$, 2. mit $CaCl_2$ ohne NaCl, 3. ohne Salz, nur mit Puffer. Dabei zeigte sich ein Synergismus. (Tabelle XXI.)

Ein Vergleich der Röhrchen 6 und 6a zeigt die Wirksamkeit der Anwesenheit des $CaCl_2$. Noch deutlicher wurde der Synergismus als wir mit der $CaCl_2$-Konzentration noch um ein Geringes hinaufgingen. (Tabelle XXII.)

Die Flockung ist nicht nur stark nach rechts verbreitert (siehe Kontrollen und Tabelle III), sondern die Beschleunigung der Flockung ist eine so erhebliche (siehe Röhrchen 1 und 2: die Flockung beginnt stark nach einer Minute), daß man fast von Potenzierung der Wirkung des Salzgemisches sprechen kann.

Daß es nicht etwa an der Erhöhung des Gesamtelektrolytgehalts durch Zufügung von $CaCl_2$ liegt, beweist folgendes Versuchsprotokoll, bei dem die Molarität (und somit die Kationenkonzentration) in jedem Röhrchen sich in der üblichen Weise mit dem Quotienten 2 abstuft, der entsprechende Teil an NaCl für das zugefügte $CaCl_2$ aber fortgelassen wurde.

Tabelle XXIII.

Versuch 119. $CaCl_2$ konstant m/2048. NaCl variiert. „Soll p_H" 3,0. Reihe angesetzt um 2 Uhr 19 Minuten.

Gesamtelektrolytgehalt	m/128	m/256	m/512	m/1024
Endkonzentration an NaCl	m/136,5	m/292,6	m/682,7	m/2048
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048
Flockungsgrad 11. XI. 2h42′ .	×	±	0	0
3 30 .	××××	×	Sp	0
12. XI. 9 30 .	vst	vst –	vst – –	Sp

Auch hier ist die Flockung nach rechts erweitert und beschleunigt. Dieser Synergismus wurde nun auch für p_H 5 und für die Kombination NaCl + $AlCl_3$ bei p_H 3,0 und 5 gefunden.

Der Veränderung des p_H entsprechend, mußten auch die Zusatzkonzentrationen an $CaCl_2$ bzw. $AlCl_3$ passend ausgewählt werden. (Tabelle XXIV, XXV und XXVI.)

Tabelle XXI.

Versuch 117. „Soll p_H" 3,0 durch Lactatpuffer. Reihe angesetzt um 1 Uhr 4 Minuten. NaCl variiert + $CaCl_2$ m/4096 konstant.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*)	6a*)	7a*)
Endkonzentration an NaCl	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	0	0	0	m/64	m/128
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/4096	m/4096	m/4096	m/4096	m/4096	m/4096	m/4096	m/4096	0	0	0	0
NaCl, m/1	5	2,5	1,25	0,625	0,31							
„ „ m/10						1,56	0,78				1,56	0,78
$CaCl_2$, m/1000	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4		0	0	0
Lactatpuffergem., p_H 3,0	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	0	1,3	1,3
Cholesterinsuspension	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Aqua dest.	0	2,8	3,05	3,67	3,99	2,74	3,52	4,3	6,7	8,0	5,14	5,92
Flockungsgrad												
10. XI. um 1h35′	××	×⁺	×	×	Sp	0	0	0	0	0	0	0
„ 2 08	××××	××××	×××	××	×	Sp	0	0	0	0	0	0
„ 3 05	××××××	×××××	××××	×××	××	Sp⁺	0	0	0	0	0	0
11. XI. „ 9 30	vst	vst	vst	vst –	vst – –	×××	0	0	0	0	0	0
„ 12 20	vst	vst	vst	vst	vst	fast vst	0	0	0	0	Sp	0
p_H gemessen	—	—	—	—	—	3,05	3,01	3,02	2,94	—	2,99	3,03

*) Kontrolle.

Tabelle XXII.

Versuch 118. „Soll p_H" 3,0 (Lactatpuffer). Reihe angesetzt um 1 Uhr 2 Min. NaCl variiert + $CaCl_2$ m/2048 konstant.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8*)	9*)	3a*)	4a*)
Endkonzentration an NaCl	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	0	0	m/64	m/128
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	0	0	0
Flockungsgrad											
11. XI. um 1h03′	×××⁺	××⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„ 1 07	××××××	××××	×	0	0	0	0	0	0	0	0
„ 1 20	vst	××××××	×××	Sp	0	0	0	0	0	0	0
„ 1 45	vst	vst	×××××	×⁺	×	Sp	0	0	0	0	0
„ 1 55	vst	vst	vst	×××	××	×⁺	Sp	0	0	0	0
12. XI. „ 9 30	vst	vst	vst	vst –	vst – –	vst – – –	[illegible]	Sp	0	Sp	0
p_H gemessen	—	2,98	—	3,03	—	3,03	—	2,98	—	—	—

*) Kontrolle.

Versuch 120. „Soll p_H“ 5,0 (Acetatpuffer). NaCl variiert + $CaCl_2$ konstant m/512. Reihe angesetzt um 10 Uhr 47 Min.

Endkonzentration an NaCl	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	0 *)	0 *)	m/64 *)	m/128 *)
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/512	m/512	m/512	m/512	m/512	m/512	0	0	0
Flockungsgrad 12. XI. um 11h01′	×	Sp	±	0	0	0	0	0	0
„ 12 15	××××××	×××××	×××	×+	Sp	0	0	0	0
„ 1 04	vst -	vst - -	××××	×××	Sp	±	0	0	0
„ 3 15	vst	vst	vst -	vst - - -	×	±	0	0	0
13. XI. „ 9 30	vst	vst	vst	vst	vst - - -	×	0	0	0
p_H gemessen	—	—	4,74	4,74	—	4,77	—	4,81	4,77

*) Kontrolle.

Tabelle XXV.

Versuch 121. „Soll p_H“ 3,0 (Lactatpuffer). NaCl variiert + $AlCl_3$ konstant m/16384.

Endkonzentration an NaCl	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	0 *)	0 *)	m/64 *)	m/128 *)
Endkonzentration an $AlCl_3$	m/16384	m/16384	m/16384	m/16384	m/16384	m/16384	m/16384	m/16384	m/16384	0	0	0
Flockungsgrad 12. XI. um 12h35′	×××	××	×	Sp	±	±	0	0	0	0	0	0
„ 1 07	×××××	×××	××	×	Sp	±	0	0	0	0	0	0
„ 3 09	vst	vst	×××××	××××	Sp	±	0	±	±	0	0	0
13. XI. „ 9 30	vst	vst	vst	vst -	Sp	±	Sp	Sp	Sp	0	Sp	0
p_H gemessen	—	—	3,00	—	3,05	—	3,05	—	3,03	—	—	—

*) Kontrolle.

Tabelle XXVI.

Versuch 125. „Soll p_H“ 5,0 (Acetatpuffer). NaCl variiert + $AlCl_3$ konstant m/32768. Reihe angesetzt um 12 Uhr 15 Min.

Endkonzentration an NaCl	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	m/8192	m/16384	0	0 *)	m/256 *)	m/512 *)
Endkonzentration an $AlCl_3$	m/32768	m/32768	m/32768	m/32768	m/32768	m/32768	m/32768	m/32768	m/32768	0	0	0
Flockungsgrad 16. XI. um 12h57′	×+	×	Sp	±	Sp	±	±	0	0			
„ 1 45	××××	×××	××	×	×	× —	Sp +	Sp	Sp	0	0	0
„ 3 00	vst	vst — —	××××××	×××××	××××	×××	××+	××+	×+	0	0	0
p_H gemessen	—	—	4,70	—	4,66	—	4,64	—	2,64	—	—	—

*) Kontrolle.

V. Versuche mit Salzgemischen an Lecithin bei „Soll p_H" 2,0 und 5,0.

Zunächst wurde $CaCl_2$ in an sich noch nicht flockender Konzentration (m/256) zu abgestufter NaCl-Reihe zugegeben und gleichzeitig eine NaCl-Reihe ohne $CaCl_2$ angesetzt. Der Versuch verlief folgendermaßen:

Tabelle XXVII.

Versuch 104. 3. Nov. 1925. „Soll p_H" 2,0 (Tartratpuffer). Reihen angesetzt um 2 Uhr 15 Minuten.

A. NaCl variiert ohne $CaCl_2$.

Endkonzentration an NaCl	m/16	m/32	m/64	m/128
Flockungsgrad 4. XI. . . .	0	0	0	0
5. XI. 9h30'.	×××	×××	0	0

B. NaCl variiert mit CaCl (m/256) konstant.

Endkonzentration an NaCl	m/16	m/32	m/64	m/128
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/256	m/256	m/256	m/256
Flockungsgrad 4. XI. . . .	0	0	0	0
5. XI. 9h30'.	0	0	0	0
6 40 .	Sp	0	0	0
6. XI. 9 30 .	×××	×××	0	0

Die Flockung war also durch die Anwesenheit des $CaCl_2$ gehemmt. Viel deutlicher trat dieser Antagonismus aber hervor, wenn $CaCl_2$ in zwar nicht optimaler, aber doch schon flockender Konzentration zugesetzt wurde. Es zeigte sich dann eine abgestufte Hemmung der durch $CaCl_2$ an sich hervorgerufenen Flockung.

Tabelle XXVIII.

Versuch 106. NaCl variiert + $CaCl_2$ konstant m/128. „Soll p_H" 2,0 (Tartratpuffer). Reihe angesetzt um 11 Uhr 5 Minuten.

Endkonzentr. an NaCl	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	0
Endkonzentr. an $CaCl_2$	m/128	m/128	m/128	m/128	m/128	m/128	m/128
Flockungsgrad							
4. XI. 2h30'	0	0	0	0	Sp	Sp	×
2 40	0	0	0	0	×	×	××
3 10	0	0	0	0	××	××	××
5 10	0	0	0	××	××××	××××	××××
5. XI. 9 30	vst -	vst -	vst -	vst -	vst	vst	vst
p_H gem. (Chinhydr.)	—	—	—	2,24	2,22	—	—

Hier ergibt sich also das bisher ungewohnte Bild, daß die Flockung mit abnehmender Konzentration des Salzgemisches zunimmt.

Ein mit KCl und $CaCl_2$ vorgenommener Versuch zeigt das gleiche Verhalten wie bei NaCl + $CaCl_2$.

Bei Vermehrung des Versuchs-p_H auf 5,0 mußte wieder die Zusatzkonzentration von $CaCl_2$ den neuen Verhältnissen angepaßt werden, entsprechend der dann etwas geringeren Wirksamkeit des $CaCl_2$ (siehe Tabelle XX). Es wurde m/64 gewählt.

Tabelle XXIX.

Versuch 107a. „Soll p_H" 5,0. NaCl variiert + $CaCl_2$ (m/64) konstant. Reihe angesetzt 4 Uhr 50 Minuten.

Endkonzentration an NaCl	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	0
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/64	m/64	m/64	m/64	m/64	m/64
Flockungsgrad						
4. XI. 5h05'	0	0	0	0	0	Sp
5 30	0	0	0	0	±	×
5. XI. 9 30	0	0	0	××	×××	×××
p_H gem. (Chinhydron) .	—	—	—	4,74	4,76	—

Prinzipiell gleich verlaufen die Versuche mit NaCl + $AlCl_3$ bei p_H 7,0 und p_H 5,0, nur noch schneller, entsprechend der höheren Wirksamkeit des $AlCl_3$.

Tabelle XXX.

Versuch 108. „Soll p_H" 2,0 (Tartratpuffer). NaCl variiert + $AlCl_3$ konstant m/4096. Reihe angesetzt um 1 Uhr 10 Minuten.

Endkonzentration an NaCl	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	0
Endkonzentration an $AlCl_3$	m/4096	m/4096	m/4096	m/4006	m/4096	m/4006
Flockungsgrad						
4. XI. 2h07'	0	0	0	0	Sp	Sp
2 13	0	0	0	Sp	Sp	Sp+
2 38	0	0	0	Sp	Sp+	×××
3 00	0	0	0	×	××	×××××
3 15	0	0	0	×	××+	vst -
5 00	0	0	Sp	×××	×××××	vst
5. XI. 9 30	vst - -	vst -	vst -	vst -	vst	vst
p_H gem. (Chinhydron) .	—	—	—	2,21	2,24	—

Analog ist das Verhalten bei p_H 5,0.

Um den Antagonismus auch noch auf andere Weise zu prüfen, wurden vier Versuche mit abgestuftem $CaCl_2$-Gehalt von m/16 bis m/128 angesetzt, während die NaCl-Konzentration innerhalb eines Versuchs konstant gehalten und von Versuch zu Versuch von m/4 bis m/32 abgestuft war. Dabei zeigte sich stärkste Hemmung bei m/4, die kontinuierlich abnahm bei m/32.

Tabelle XXXI.

Versuch 110. „Soll p_H“ 5,0. (Acetatpuffer).

A. NaCl konstant m/4 + $CaCl_2$ variiert (m/16 bis m/128) } Reihe angesetzt
B. NaCl konstant m/8 + $CaCl_2$ variiert (m/16 bis m/128) } um 12 Uhr 50 Min.
C. NaCl konstant m/16 + $CaCl_2$ variiert (m/16 bis m/128) } Reihe angesetzt
D. NaCl konstant m/32 + $ClaCl_2$ variiert (m/16 bis m/128) } um 12 Uhr 52 Min.

Endkonzentration an $CaCl_2$	m/16	m/32	m/64	m/128	0	
Flockungsgrad 5. XI. um 1h05′	0	0	0	0	0	A
„ 1 19	0	0	0	0	0	A
„ 2 14	×	0	0	0	0	A
„ 5 30	vst	×××	0	0	0	A
„ 1 05	Sp	0	0	0	0	B
„ 1 19	Sp+	±	0	0	0	B
„ 2 14	×××	××	0	0	0	B
„ 5 30	vst −	vst −	0	0	0	B
„ 1 07	Sp	Sp	0	0	0	C
„ 1 20	×	××	0	0	0	C
„ 2 16	××××−	××××	0	0	0	C
„ 5 32	vst −	vst −	0	0	0	C
„ 1 07	Sp	×	0	0	0	D
„ 1 20	××	×××	0	0	0	D
„ 2 16	×××××−	×××××	±	0	0	D
„ 5 32	vst −	vst −	××	0	0	D
p_H gemessen (Chinhydron) A	—	4,74	4,77	—	—	
B	—	4,78	4,83	—	—	
C	—	4,83	4,85	—	—	
D	—	4,87	4,87	—	—	

Schließlich seien noch zwei Versuche angeführt, die beweisen, daß derselbe Antagonsimus auch für $CaCl_2 + AlCl_3$ sowohl bei p_H 2,0 wie bei p_H 5,0 besteht. (Tabelle XXXII.)

So zeigen die Versuche an Lecithin mit Salzgemischen durchgehend einen Antagonismus.

VI. Versuche mit Cholesterin-Lecithingemischen.

Um die Flockung in einem Cholesterin-Lecithingemisch, in dem die Cholesterinendkonzentration wie immer 0,01 Proz. betrug, beobachten zu können, wurde mit der Lecithinendkonzentration auf den zwanzigsten Teil der sonst benutzten heruntergegangen. Diese Lecithinverdünnung allein ohne Cholesterin hat ein fast wasserklares Aussehen.

Zunächst wurde nun ein Vorversuch mit $CaCl_2$ und dem angegebenen Cholesterin-Lecithingemisch gemacht bei p_H 2,0, bei dem Cholesterin allein sonst schnelle Flockung zeigt, Lecithin dagegen nicht. (Tabelle XXXIII.)

Tabelle XXXII.

Versuch 115. $CaCl_2$ variiert + $AlCl_3$ konstant m/2048. „Soll p_H“ 2,0 (Tartratpuffer). Reihe angesetzt um 2 Uhr 29 Minuten.

Endkonzentration an $AlCl_3$	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048	m/2048
Endkonzentration an $CaCl_2$	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	0
Flockungsgrad 6. XI. um 2h30'	0	0	0	0	0	0	0	±	Sp	Sp	Sp
„ 3 07	0	0	0	0	0	±	×××	××××	××××	××××	××××
„ 3 55	0	0	0	0	0	×	vst – –	vst	vst	vst	vst
p_H gemessen	—	1,89	2,03	2,18	—	2,42	—	2,55	—	2,54	—
Versuch 116. Genau wie Versuch 115, nur mit Acetatpuffer p_H 5,0. Reihe angesetzt um 3 Uhr 15 Minuten.											
Flockungsgrad 6. XI. um 3h16'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sp
„ 3 55	0	0	0	0	0	0	0	Sp	Sp	×	××
p_H gemessen	4,16	—	4,62	—	4,80	—	—	5,12	—	—	—

Tabelle XXXIII.

Versuch 126. „Soll p_H“ 2,0 (Tartratpuffer). Salz: „$CaCl_2$“. Cholesterinendkonzentration 0,01 Proz. Lecithinendkonzentration 0,02 Proz. Reihe angesetzt 4 Uhr 35 Minuten.

Endkonzentration an $CaCl_2$	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	0 *)	0 *)
Cholesterinsuspension	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lecithinsuspension 4 mal verd.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0
Flockungsgrad 17. XI. um 5h00'	Sp⁺	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	±	0	0	0	0	0	0	××××
„ 5 30	×	×	×	×	×	×	×⁻	±	0	0	0	0	0	vst – –
18. XI. „ 1 00	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	Sp⁺	Sp	Sp	Sp	Sp	±	vst

*) Kontrollen.

Während also die Cholesterinkontrolle *ohne* Lecithin nach 25 Minuten starke Flockung zeigt, nach 55 Minuten nahezu ganz geflockt hat, ist die andere Cholesterinkontrolle *mit* Lecithin nach 20 Stunden ± geflockt. Die $CaCl_2$-Flockung reicht herunter bis m/128, also bis zu der bei p_H 2,0 früher festgestellten Lecithingrenzkonzentration.

Das Lecithin übt also einen äußerst stark hemmenden Einfluß auf die Cholesterinflockung aus, ja prägt ihm überhaupt seinen Flockungscharakter auf. Dabei ist zu beachten, daß die Anwesenheit des Lecithins für das bloße Auge gegenüber der viel stärkeren Cholesterintrübung (Vergleich der angegebenen Verdünnungen ohne Salzzusatz) kaum bemerkbar ist.

Dieses Verhalten zeigt sich nun auch in den folgenden systematisch angestellten Versuchen.

Bevor wir zu diesen übergehen, ist aber noch ein Versuch zu erwähnen, der Aufschluß über das Verhalten der Schutzwirkung des Lecithins auf das Cholesterin bei variierter Lecithinkonzentration geben soll. Der Versuch wurde wieder bei p_H 2,0 gemacht, bei dem Cholesterin allein stark flockt.

Tabelle XXXIV.

Versuch 127. Cholesterin-Lecithingemisch. „Soll p_H" 2,0 (Tartratpuffer). Cholesterinkonzentration konstant 0,01 Proz., Lecithinkonzentration variiert.

Reihe angesetzt um 5 Uhr.

Endkonz. an Cholesterin, Proz.	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01 *)
Endkonzentr. an Lecithin, Proz.	0,015	0,01	0,005	0,0025	0
Flockungsgrad					
17. XI. um 5h25' . .	0	0	0	0	××××
18. XI. „ 1 00 . .	±	Sp	×	×+	vst
p_H gemessen	2,24	—	—	2,23	—

*) Kontrolle.

Mit abnehmender Lecithinkonzentration nimmt auch die Schutzwirkung ab, bleibt jedoch bei 0,0025 Proz. Lecithin immer noch beträchtlich gegenüber der Kontrolle. Diese Lecithinkonzentration (0,0025 Proz.) erscheint ohne Vorhandensein von Cholesterin wie Wasser.

Für die folgenden Versuche wurde nun nicht mehr ein p_H zugrunde gelegt, bei dem Cholesterin noch flockt, sondern p_H 3,0, bei dem es stabil bleibt.

Tabelle XXXV.

Versuch 128. „Soll p_H“ 3,0 (Lactatpuffer). „NaCl“. Cholesterin-Lecithingemisch. Cholesterinendkonzentration 0,01 Proz. Lecithinendkonzentration 0,02 Proz. Reihe angesetzt um 2 Uhr 40 Minuten.

A. Mit Lecithin. B. Kontrolle ohne Lecithin.

Endkonz. an NaCl	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	0	
Flockungsgrad									
19. XI. 4h06′	××	×	Sp	0	0	0	0	0	A
5 05	×××	××	Sp	±	0	0	0	0	A
20. XI. 9 30	vst	vst	Sp	±	0	0	0	0	A
4h02′	×××××	××××	×××	××	×	Sp	±	±	B
5 05	××××××	×××××	××××	×××	××	×+	Sp	Sp	B
20. XI. 9 30	vst	vst	vst	vst –	vst – –	××××	Sp	Sp	B
p_H gemess. A	—	2,86	2,93	—	—	—	—	—	
p_H gemess. B	—	2,84	2,96	—	—	—	—	—	

In diesem Versuch zeigt sich wieder die deutliche Hemmung. Kontrolle B ist zu gleicher Zeit angesetzt wie Reihe A und flockt in gleichen Ablesungszeiten stärker und weiter nach rechts reichend. Im ganzen war diese Cholesterinsuspension etwas empfindlicher als frühere, denn die salzfreie Cholesterinkontrolle bleibt nicht ganz stabil.

Ganz analog, nur mit geringen Unterschieden, verlaufen die Versuche mit den übrigen Alkalien.

Tabelle XXXVI.

Zum Vergleich mit der Kontrolle siehe Flockungsgrad vorige Tabelle Nr. XXXV bei B. Reihe mit KCl und NH_4Cl angesetzt um 2 Uhr 47 Minuten. Reihe mit LiCl angesetzt um 4 Uhr 35 Minuten.

	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	
um 4h15′ . . .	×+	×	±	0	0	KCl
„ 5 10 . . .	×+	×	Sp	0	0	KCl
20. XI. „ 9 30 . . .	vst	vst	Sp	Sp	0	KCl
p_H gemessen	—	3,03	3,00	—	—	
um 5h00′ . . .	××	×	Sp	0	0	NH_4Cl
20. XI. „ 9 30 . . .	vst	vst	×+	Sp	0	NH_4Cl
p_H gemessen	—	2,96	2,98	—	—	
20. XI. um 9h30′ . . .	vst	vst	××+	Sp	Sp	LiCl
p_H gemessen	—	2,94	2,98	—	—	LiCl

Am deutlichsten wird das Verhalten des Cholesterin-Lecithingemisches klar bei den dreiwertigen Salzen. (Tabelle XXXVIII.)

Wie schon aus den Versuchen mit den Alkalien und Erdalkalien zu sehen war, flockte das Gemisch immer in der bei Lecithin allein gefundenen Zone, so daß die Flockungsgrenze gegenüber dem reinen Cholesterinversuch nach links verschoben war. Hier findet sich nun dieselbe Flockungszone wie beim Lecithinversuch (siehe Tabelle XIII), nur um ein Glied nach links verschoben, wegen des um 1,0 saureren p_H,

Tabelle XXXVII.

Versuch 133. „Soll p_H“ 3,0. Lactatpuffer. Salz: $CaCl_2$. Cholesterinkonzentration 0,01 Proz. Lecithinkonzentration 0,02 Proz. Reihen angesetzt um 2 Uhr 32 Minuten. A. Cholesterin + Lecithin. B. Cholesterin *ohne* Lecithin.

	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4096	0	
Flockungsgrad												
20. XI. um 3 06′	××	××	××	××	×⁺	0	0	0	0	0	0	A
„ 4 25	×××	×××	×××	×××	××	Sp	±	0	0	0	0	A
21. XI. „ 9 30	vst	vst	vst	vst	vst –	Sp	0	0	0	0	0	A
„ 4 30	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	0	B
21. XI. „ 9 30	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst	vst – – –	B
p_H gemessen A	—	—	—	—	3,19	3,21	—	—	—	—	—	
p_H gemessen B	—	—	—	—	3,09	3,15	—	—	—	—	—	

Tabelle XXXVIII.

Versuch 136. „Soll p_H“ 3,0 (Lactatpuffer). Salz: $AlCl_3$. Cholesterinkonzentration 0,01 Proz. Lecithinkonzentration 0.02 Proz. Reihen angesetzt um 11 Uhr 35 Minuten. A. Cholesterin mit Lecithin. B. Cholesterin *ohne* Lecithin.

Endkonz an $AlCl_3$	m/128	m/256	m/512	m/1024	m/2048	m/4098	m/8192	m/11 683	m/32 768	0	
Flockungsgrad											
21. XI. um 1h 11′	0	0	×	×	Sp	0	0	0	0	0	A
23. XI. „ 9 30	0	0	vst	vst	vst –	0	0	0	0	0	A
„ 1 10	×××××	××××	×××	×××	×××	×××	×××	×××	×××	××	B
„ 3 35	vst –	vst –	vst – – –	vst – – –	××××××	×××××	×××××	××××	××××	××××	B
p_H gemessen A	—	2,86	2,98	—	—	—	—	—	—	—	
p_H gemessen B	—	—	2,98	—	—	—	—	—	—	—	

während rechts und links davon die Flockung völlig, auch nach 1 ½ Tagen, ausbleibt. Die reine Cholesterinkontrolle flockt binnen 4 Stunden fast völlig. *Der Flockungscharakter des Lecithins prägt sich also dem Lecithin-Cholesteringemisch auf.* Es findet aber insofern eine gegenseitige Hemmung statt, als die Flockung beim Lecithin-Cholesteringemisch in der flockenden Zone langsamer verläuft als beim reinen Lecithinversuch.

Zu erwähnen ist, daß sich auch hier wieder, wie beim Lecithin allein, die Dispersitätsveränderung sofort nach dem Zusammengießen der Röhrchen kenntlich macht. Beim Cholesterin-Lecithingemisch ist die Zone von m/572 bis m/2048 stärker getrübt als die der benachbarten Röhrchen, während die Kontrolle ohne Lecithin gleichmäßig ohne Zonenbildung ist.

Der Versuch mit Cerochlorid verläuft ganz analog.

Diese Versuche wurden nun für p_H 5 und ohne Pufferzusatz ausgeführt, ohne daß an den Gesamtverhalten sich etwas ändert. Auch die obere Zone von m/286 bis m/8, die in Tabelle XXXVIII nicht enthalten ist, ist vorhanden.

Zusammengefaßt ergibt sich also:

1. Beimengung von Lecithinsuspension zu Cholesterinsuspension, in einer Menge, die destilliertem Wasser ohne Cholesterin kaum einen Hauch von Trübung verleiht, hemmt die Cholesterinflockung sehr stark.

2. Geht man mit der Lecithinverdünnung in abgestufter Reihe so weit herunter, daß sich die Lösung für das bloße Auge überhaupt nicht mehr von Wasser unterscheidet (0,0025 Proz.), so nimmt die Hemmung allmählich ab, bleibt aber immer noch beträchtlich (Flockung nach 20 Stunden $\times^{+}$, Kontrolle: vst).

3. Das Lecithin prägt dem Cholesterin *seinen* Flockungscharakter auf — die Flockungszonen bleiben dieselben wie beim Lecithin allein —, wird aber seinerseits wiederum von Cholesterin gehemmt, was sich in geringerer Flockungsgeschwindigkeit gegenüber dem reinen Lecithinversuch zeigt. Es liegt also eine Schutzwirkung des Lecithins auf das Cholesterin vor.

VII. Versuche über den Einfluß kapillaraktiver Stoffe auf die Flockung von Cholesterin und Lecithin.

Es wurde zunächst sowohl für Cholesterin wie für Lecithin eine $CaCl_2$-Reihe bei p_H 5,0 angesetzt, bei der in jedem Röhrchen 3 ccm Wasser durch 3 ccm einer gesättigten Isobutylurethanlösung ersetzt waren. Beim Lecithin wie beim Cholesterin wurde keinerlei Einfluß des Isobutylurethans beobachtet. Die Flockung verlief, sowohl was die Lage der Grenzkonzentration als auch den zeitlichen Verlauf anbelangt, völlig normal.

Dann wurden dieselben Versuche angesetzt, nur wurde das Verdünnungswasser durch mit Thymol gesättigtes Wasser ersetzt. Für Cholesterin zeigte sich wiederum völlige Indifferenz. Dagegen begegnet man beim Lecithin einem besonderen Verhalten.

Tabelle XXXIX.

Versuch 164. Lecithinsuspension. Salz: $CaCl_2$. „Soll p_H" 5,0 (Acetatpuffer). Mit Thymol gesättigtes Verdünnungswasser. Reihe angesetzt um 11 Uhr.

Endkonz. an $CaCl_2$	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128	m/256 ... m/2048
Flockungsgrad								
13. XII. 11h00'	0	×	×	×	×	×	0	0
11 05	0	××××	××××	××××	××××	××××	0	0
11 15	0	vst -	vst -	vst -	vst -	vst -	0	0
11 40	×	vst	vst	vst	vst	vst	0	0
1 00	×××	vst	vst	vst	vst	vst	××	0

m/256 bis m/2048 sind sehr stark getrübt, bleiben aber auch am nächsten Tage noch stabil.

Vergleicht man den entsprechenden Lecithinversuch ohne Thymol (siehe Tabelle XV) mit dem Thymolversuch, so ist in letzterem außer einer geringen Verbreiterung der Flockung um ein Glied nach rechts und links vor allem *die sehr starke Beschleunigung der Flockung* auffallend. Alle Röhrchen beginnen fast momentan mit der Flockung, die im Versuch ohne Thymol teilweise erst am nächsten Tage geflockt sind.

VIII. Versuche mit den Systemen: Lecithin—Serum, Cholesterin—Serum, und Cholesterin—Lecithin—Serum.

Zum Schluß wurden Versuche angestellt über den Einfluß von Serumbeimengung zu Lecithin, Cholesterin und Lecithin-Cholesterinsuspensionen.

Es war unmöglich, auf diese Versuche die bis hierher befolgte systematische Weise anzuwenden wegen der Komplikationen, die sofort erscheinen, wenn eine so komplexe Komponente wie Serumeiweiß hinzutritt. Es werden also im folgenden die Versuche nacheinander so beschrieben, wie sie sich organisch auseinander entwickelten.

Zunächst wurde von einem menschlichen elektrodialysierten Serum (Leitfähigkeit $1{,}8 \cdot 10^{-5}$; p_H 5,05) eine 20 fache Verdünnung mit Lecithin (4 Proz.) hergestellt und je 1 ccm dieses Gemisches zu einer Reihe mit abgestuftem Puffergemisch zugesetzt. Dabei trat eine *momentane* massige Flockung bei p_H 4,0 auf, also eine Verschiebung der Lecithinflockung ins Alkalische, wie sie auch *Michaelis*[1]) beschreibt. Die Röhrchen mit p_H 3,0 und p_H 5,0 blieben stabil.

Derselbe Versuch wurde nun mit demselben Eiweiß und auch sonst ganz analog nur mit *Cholesterin* statt Lecithin angestellt. *Die*

[1]) Michaelis Praktikum d. phys. Chem. 71, 1912.

Anwesenheit des Eiweißes änderte nichts an dem gewohnten Verhalten des Cholesterins.

Bei p_H 2,0 nach 15 Minuten vollständige Flockung.
„ p_H 3,0 vollkommene Stabilität.
„ p_H 4,0 „ „
„ p_H 5,0 „ „

Bei Wiederholung dieses Versuches mit einem anderen elektrodialysierten Serum [p_H 5,8[1])] ergab sich plötzlich ein ganz anderes Verhalten. Schon bei der Herstellung der 20maligen Verdünnung mit Lecithin *erfolgte momentane Flockung*; ebenso wurde die Cholesterinsuspension innerhalb weniger Minuten vollständig geflockt, und zwar *bei völliger Abwesenheit von Salzen.* Die Lecithinflockung war durch Zusatz von Acetatpuffer (p_H 5,0) nicht reversibel. Durch Phosphatpuffer (p_H 7,0) aber wurde das Gemisch so weit stabilisiert, daß die Flockung erst sehr langsam eintrat (erzieltes p_H 6,69). Der isoelektrische Punkt des Gemisches liegt also weiter im Alkalischen. Am Neutralpunkt etwa wird es stabil. Es wurde nun folgender Versuch mit dem zuletzt besprochenen Serum gemacht:

Tabelle XL.

22. Dezember 1925.

Reihe angesetzt um 12 Uhr 30 Minuten.

	1	2
Serum	0,3	0,3
Phosphat-Puffergemisch, p_H 7,1, m/100 Na	0,3	0,3
Cholesterinsuspension	1,0	1,0
Lecithinsuspension	0,04	0,0

d. h. also einmal *mit* Lecithin, einmal *ohne* Lecithin.

	1	2
Flockungsgrad 22. XII. 8 30′	0	Sp
4 00	0	×
5 30	0	×⁺
23. XII. 9 30	±	vst--
p_H gemessen	6,62	6,69

Die Pufferung war also etwas nach der sauren Seite durchbrochen, so daß die Tendenz zur Flockung bestehen blieb. *Röhrchen 1 mit Lecithin zeigt wieder eine erhebliche Schutzwirkung der Flockung.*

Als nun bei der sonst gleichen Versuchsanordnung wie eben der Phosphatpuffer fortgelassen wurde, die Reaktion also etwas sauer war, trat, wie zu erwarten, in beiden Röhrchen Flockung ein. Diese Flockung war aber 4 Stunden nach dem Ansetzen merkwürdigerweise im Röhrchen *mit* Lecithin durch 2 Tropfen 4 n NaOH momentan reversibel, im Röhrchen *ohne* Lecithin dagegen *nicht*. p_H war sicher über 8,0 in beiden Röhrchen, wie durch Phenolphthalein festgestellt wurde.

Diese Versuche mit Serum sind weiter ausbaufähig. Vor allem müssen sie mit möglichst definierten Eiweißkörpern, etwa kristallisiertem Eieralbumin angestellt werden. Wir haben uns aber zunächst auf diese

[1]) Leitfähigkeit $2{,}7 \cdot 10^{-5}$.

mitgeteilten Versuche beschränkt, aus denen schon hervorgeht, daß sich Regeln wie Sensibilisierung des Cholesterins durch Serum so allgemein nicht aufstellen lassen, wie es zuweilen geschieht.

Schließlich haben wir durch Zufall die Erfahrung gemacht, daß nicht einmal alle Cholesterinpräparate sich einheitlich erweisen. Denn ein Probeversuch mit Cholesterin (*Merck*), einem äußerlich vollkommen dem *Kahlbaum*schen gleichenden Präparat, das sich aber im Gegensatz zu diesem in Aceton nur mit einer leichten Trübung löste, zeigte eine erheblich größere Labilität [Flockung bei p_H 6,0 (m/100 Na˙)]. Der Ursache dieser Verschiedenheit sind wir nicht nachgegangen. Ein uns von der Firma C. H. Boehringer Sohn in Niederingelheim liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellte Speziallecithinpräparat, das sich bei serologischen Versuchen von *H. Sachs* und *A. Klopstock*[1]) gegenüber dem *Merck*schen als different erwiesen hatte, ergab in einigen Probeversuchen außer etwas schnellerer Flockung keine Unterschiede.

Das verschiedene Verhalten der beiden Cholesterinpräparate kann den Wert des Mitgeteilten nicht beeinträchtigen. Denn die Versuche wurden alle an dem gleichen Präparat angestellt und auf Grund der an diesem gefundenen Eigenschaften kombiniert. Außerdem wird es sich bei der Differenz der Präparate weniger um Wesensverschiedenheiten als um quantitative Unterschiede, also um Unterschiede der absoluten Werte handeln.

Mit einer relativ groben Methodik — denn als solche muß die Flockungsbeobachtung gelten — wurden Cholesterin und Lecithin jedes für sich und kombiniert untersucht, mit Beachtung des Salzgehalts und der Wasserstoffionenkonzentration. Dabei zeigten sich hemmende und fördernde Einflüsse, die teils von seiten des Cholesterins und Lecithins, teils von dem Milieu ausgehen.

Man gewinnt aus den Versuchen die Vorstellung, daß der Organismus, der als feinerer Indikator schon auf weit geringere Veränderungen reagiert als es unsere Methodik vermag, neben dem artspezifischen Aufbau des Eiweißes in den Faktoren des Lecithins und Cholesterins, den Schwankungen der H-Ionenkonzentration und der Relation der einzelnen Elektrolyte zueinander, ein fein äquilibriertes System besitzt, das in sich schon reiche Möglichkeit birgt, auf Störungen durch Zustandsänderung desselben zu antworten.

Zusammenfassung.

Die Flockung durch H-Ionen für das von uns verwandte Cholesterin ergibt als Grenze zwischen flockender und nichtflockender Suspension bei einem Puffergehalt von $^1/_{100}$ Molarität unabhängig von der Art des

[1]) Diese Zeitschr. **159**, 491, 1925.

gewählten Puffers p_H 2,4 bis p_H 3,2, während sie für die HCl-Flockung ohne Puffer wegen der fehlenden additiven Wirkung der Na-Ionen um p_H 2,4 liegt. Es zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite zwischen verschiedenen sonst praktisch gleichartig hergestellten Suspensionen.

Flockung durch die Chloride ein-, zwei- und dreiwertiger Salze. Die Versuche wurden 1. bei einem p_H nahe an der flockenden Grenzkonzentration für H-Ionen (p_H 3,0), 2. bei p_H 5,0, 3. ohne Puffer angestellt.

Dabei ergibt sich: Je höher die Wertigkeit der flockenden Kationen ist, eine um so geringere Konzentration genügt zur Flockung.

Bei den dreiwertigen Kationen treten die sogenannten „unregelmäßigen Reihen“ auf, die im Versuch mit Puffer und ohne Puffer Verschiedenheiten zeigen. Die H-Ionen und die jeweilig angewandten Kationen addieren sich in ihrer Wirkung.

Die Flockung durch H-Ionen für das von uns angewandte Lecithin ergibt als Grenze zwischen flockender und nichtflockender Suspension, unabhängig von der Wahl des Puffers, auch bei einer HCl-Flockung ein p_H von 1,73 bis 1,75.

Flockung durch die Chloride ein-, zwei- und dreiwertiger Salze bei p_H 2,0 bis 2,2, bei p_H 5,0 und ohne Puffer ergibt: Die Alkalien flocken nur bei p_H 2,1 und relativ hohen Konzentrationen (Optimum m/2 bis m/4). Bedeutend stärker wirken die zweiwertigen Salze, was sich sowohl in der geringen optimalen Konzentration wie in der kurzen Zeit bis zum Flockungsbeginn ausspricht, $CaCl_2$ ist etwas wirksamer als $BaCl_2$. Bei den dreiwertigen Salzen treten zwei Flockungszonen auf — eine noch weit tiefer als bei den zweiwertigen gelegene und eine im Gebiet der Flockung der Alkalien. p_H-Unterschiede sind von geringer Bedeutung.

Flockung durch Salzgemische bei Cholesterin.

Die Kombinationen $Na^{\cdot}$ mit $Ca^{\cdot\cdot}$ und $Na^{\cdot}$ mit $Al^{\cdot\cdot\cdot}$ ergeben bei p_H 3,0 und p_H 5,0 einen Synergismus, der sich in der Verschiebung der Flockungsgrenze nach der Seite der geringeren Konzentrationen und in so starker Beschleunigung der Flockung zeigt, daß man fast von einer Potenzierung der Wirkung des Salzgemisches sprechen kann.

Flockung durch Salzgemische bei Lecithin.

Dieselben Versuche bei Lecithin ergeben einen Antagonismus, der auf verschiedene Weise nachgeprüft wurde.

Versuche mit Cholesterin-Lecithingemischen.

Das Lecithin übt einen sehr stark hemmenden Einfluß auf die Cholesterinflockung aus. Abnehmende Lecithinkonzentration bewirkt

abnehmende Hemmung. Dabei wirken noch Lecithinverdünnungen hemmend, die allein ohne Cholesterin und Salze wie reines Wasser erscheinen.

Das Lecithin prägt der Cholesterin-Lecithinflockung *seinen* Flockungscharakter auf, der aber wiederum durch das Cholesterin insofern verändert wird, als die Flockung langsamer verläuft als beim reinen Lecithinversuch. Es liegt also eine gegenseitige Beeinflussung vor. p_H-Unterschiede sind von unwesentlicher Bedeutung.

Der Einfluß kapillaraktiver Stoffe

a) auf die Flockung von Cholesterin: Isobutylurethan und Thymol üben keine Wirkung aus.

b) auf die Flockung von Lecithin: Isobutylurethan ist ohne Einfluß. Dagegen bewirkt Thymol eine sehr starke Flockungsbeschleunigung und eine geringe Verbreiterung der Flockungszone.

Cholesterin, Lecithin und Serum.

Die Versuche zeigen bei verschiedenen menschlichen Sera ein verschiedenes Verhalten. Während Beimengung von elektrodialysiertem Serum in einem Falle Cholesterin binnen kurzem zu vollständiger Ausflockung brachte, war es in einem anderen Falle wirkungslos. Es konnte durch Alkalisierung des Systems (bei einem flockenden Serum) eine größere Stabilität erzeugt werden. Beimengung von Lecithin wirkte auch hier hemmend auf die Flockung.

Ein Cholesterinpräparat anderer Herkunft (*Merck*) als das der Arbeit zugrunde liegende (*Kahlbaum*), das sich im Gegensatz zu letzterem in Aceton nicht klar löste, zeigte weit größere Labilität.

Die Untersuchung ist mit Unterstützung der Japan-Stiftung (Hoshi-Stiftung) der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft ausgeführt worden. Fräulein *Wunder* hat uns bei der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet.

Eine neue gebrauchsfertige Apparatur zur elektrometrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration.

Von

H. Lüers.

(Laboratorium für angewandte Chemie der Technischen Hochschule in München).

(Eingegangen am 18. Februar 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Seit den klassischen Arbeiten von *S. P. L. Sörensen* und *L. Michaelis* über die Messung und Bedeutung der ($H^{\cdot}$) ist das Bedürfnis nach einfachen, gebrauchsfertigen Apparaturen für derartige Messungen von Jahr zu Jahr gestiegen, denn es gibt heute wohl kein Laboratorium, welches sich auf biologischem oder biochemischem Gebiet betätigt, das nicht schon in die Lage gekommen wäre, Wasserstoffionenkonzentrationen messen zu müssen. Eine diesbezügliche Apparatur gehört heute ohne Frage zum unentbehrlichen Rüstzeug eines modernen Laboratoriumsbetriebs.

Nachdem wir uns schon frühzeitig mit Studien auf diesem Gebiet befaßten, waren wir vor die Aufgabe gestellt, die Apparatur nach den Angaben von *Sörensen* und *Michaelis* sowie der einschlägigen Literatur aus einzelnen Teilen, die für sich beschafft werden mußten, zusammenzustellen, und dies jedesmal zu wiederholen, wenn man die Arbeitsstätte wechselte.

Der damit verknüpfte Zeitaufwand, ferner zahlreiche Anfragen von Fachkollegen oder Interessenten nach solchen Apparaturen waren die Veranlassung, daß wir einen vollständig gebrauchsfertigen Apparat zu konstruieren versuchten. Nach einer Reihe von Versuchen gemeinsam mit der Firma F. und M. Lautenschläger, München, ist es unserer Ansicht nach gelungen, dieses Ziel in sehr befriedigender Weise zu erreichen. Da das Interesse der Fachkreise an dieser Apparatur ein sehr reges ist, soll im folgenden das Wesentliche darüber mitgeteilt werden, wobei die allgemeinen Kenntnisse über die Theorie der Messung von Gasketten vorausgesetzt werden.

Abb. 1 gibt ein allgemeines Bild über den Apparat. Auf einer gemeinsamen, gut isolierenden und verziehungsfreien Grundplatte sind die einzelnen Teile fest montiert, so daß der Apparat bequem von einem Raum in den anderen transportiert werden kann und stets gebrauchsfertig ist. Nichtsdestoweniger lassen sich aber doch die einzelnen Aggregate, wie Akkumulatoren, Normalelement, Meßinstrument, leicht von der Platte zum Zwecke der Reinigung, Prüfung, Aufladung usw. entfernen. Sämtliche Leitungen sind aus bestisoliertem Draht hergestellt und liegen an der Unterseite der Platte. Auf die

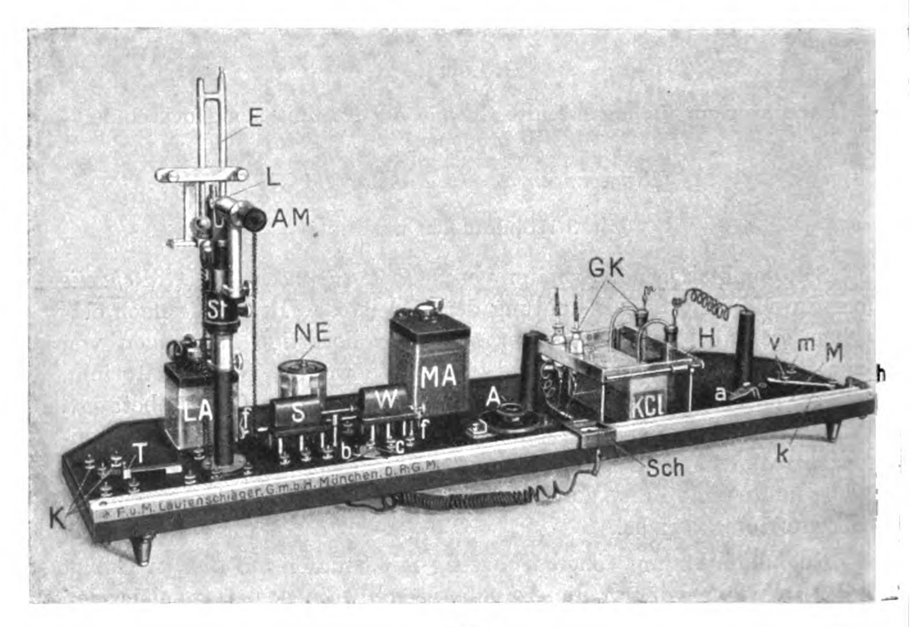


Abb. 1.

Ausführung der Klemmen ist besondere Sorgfalt verwendet worden, um Kontaktfehler möglichst zu vermeiden. Die wesentlichen Teile der Apparatur sind folgende:

In der Mitte befindet sich der Meßakkumulator (*MA*), eine Varta-Accomet-Type, der gegenüber den gewöhnlichen Akkumulatoren den Vorteil hat, daß bei Entladung mit sehr geringen Stromstärken, wie es bei diesen Messungen der Fall ist, die Kapazitätsentnahme sich über 6 Monate ohne neuerliche Aufladung erstrecken kann.

Links neben diesem Meßakkumulator ist ein gewöhnliches transportfähig gefülltes Cadmium-Normalelement von der Spannung 1,0187 Volt untergebracht.

Wie das Schaltungsschema in Abb. 2 zeigt, arbeitet der Akkumulator *MA* über die rechte und linke Klemme der Meßbrücke *M* auf den Meßdraht, wobei die vom positiven Pol ausgehende Stromzuleitung über den Ausschalter *S* führt. Der Stromkreis des Normalelements führt vom negativen Pol aus zum Wechselschalter *W* und dann entweder über das Kontaktblech *b* zum Schleifkontakt *Schl*, oder bei der Schaltung zur direkten Ablesung der Millivolt, an den Kontakthebel *h*. Der positive Pol des Normalelements *NE* ist über den Schalter *S* und den Wechselschalter *W*, mit dem Kurzschlußtaster *T* und dem Kapillarelektrometer *E* verbunden.

Dieses Meßinstrument befindet sich auf einem auf der Grundplatte montierten Stativ *St*, an welchem es durch Klemmen, leicht abnehmbar, gehalten wird. Ein Ablesemikroskop *AM* gestattet eine scharfe, stark vergrößerte Beobachtung des Menikus vor einer Okularskala, die ihren Nullpunkt in der Mitte hat, um den Ausschlag nach oben oder unten schnell übersehen zu können. Das Mikroskop ist nach drei Richtungen im Raume beweglich und feststellbar und gestattet so sehr rasch und leicht das Auffinden und Einstellen des Quecksilbermeniskus. Hinter der Kapillare ist ein elektrisches Lämpchen zur Beleuchtung des Quecksilberfadens an-

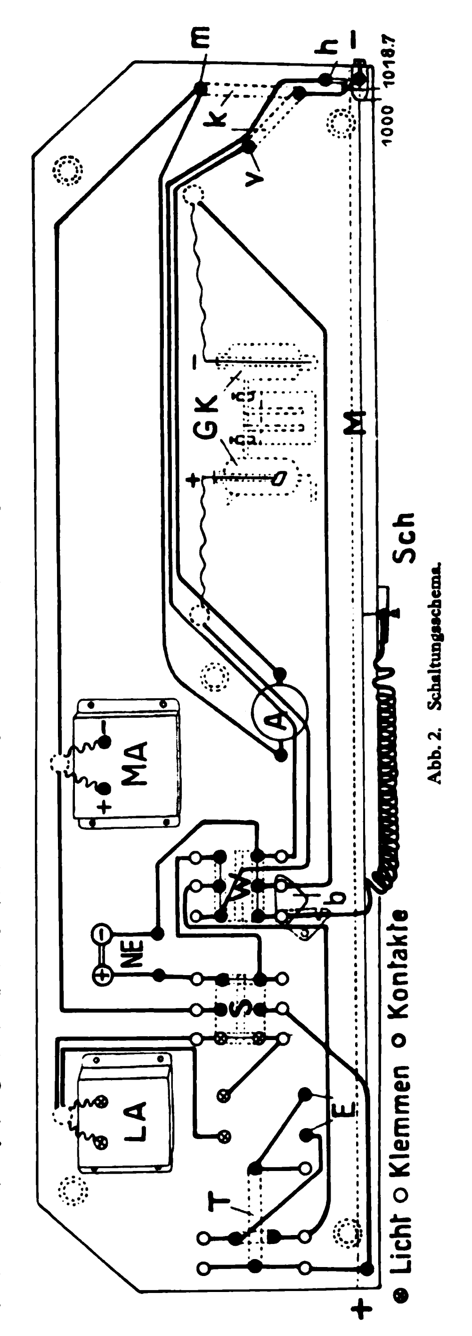


Abb. 2. Schaltungsschema.

gebracht, das vom Lichtakkumulator *LA*, ebenfalls ein Accomettyp, der über den Schalter *S* arbeitet, versorgt wird. Dadurch ist man vom Tageslicht unabhängig und kann den Apparat an jedem beliebigen Orte (trocken und frei von Säuredämpfen) aufstellen.

Auf der rechten Seite der Grundplatte ist die Gaskettenapparatur *GK* (Abb. 1) untergebracht. Sie besteht aus einer oder mehreren Bezugselektroden und den Meßelektroden, die an handlichen Elektrodenhaltern an einem Rahmen, der die Wanne umgibt, untergebracht sind. Die Schaltung der Gaskette entspricht genau derjenigen des Cadmium-Normalelements, so daß also lediglich durch Verschieben des Wechselschalters nach rechts oder links, einmal das Normalelement oder die Gaskette gegen den Akkumulator geschaltet werden kann. An Stelle der oft zu Störungen Anlaß gebenden Quecksilberwippen ist der Apparat mit sechspoligen Schubschaltern ausgerüstet, bei denen jeder einzelne Kontaktstift durch eine Spiralfeder an die Kontaktfläche gedrückt wird. Jeder Schalter ist schnell durch Lösen einer Rändelschraube *f* (Abb. 1) auseinandernehmbar und dadurch jederzeit leicht zu reinigen. Die Anordnung der Schalter ist so getroffen, daß der Schalter *S* beim Ausschalten stets den Wechselschalter *W* zwangsläufig auf seine Anfangsstellung (Normal-Element-Akkumulator) schiebt. Dies vereinfacht die Bedienung des Apparats.

Eine besondere Einrichtung am Apparat gestattet das Ablesen der EMK der Gaskette unmittelbar in Millivolt an der Meßbrücke, wie es bereits von anderer Seite (*Michaelis*, *Emslander* u. a.) geschah. Doch kann diese Einrichtung nach Belieben ausgeschaltet und mit der bislang üblichen Anordnung gemessen werden. Soll in der bisher üblichen Anordnung mit der Meßbrücke = 1000 mm gearbeitet werden, wird zunächst der Hebel *h* (Abb. 3) am rechten Ende der Meßbrücke hochgestellt, also dieser Kontakt aufgehoben. Dann wird der Kontaktwinkel *a* am rechten Ende der Brücke mit der dort seitlich angebrachten Schraube so befestigt, daß er den 1020 mm langen Meßdraht auf 1000 mm verkürzt. Weiter wird der Kontaktstreifen *k* von der Klemme *v* nach *m* gedreht, so daß er parallel der rechten Kante der Grundplatte steht, und schließlich werden durch das dreikantige Winkelblech *b* die beiden Klemmen *c* des Wechselschalters *W* (Abb. 3) miteinander verbunden.

Nun ist die Apparatur zur Messung in üblicher Weise bereit. Man verfährt, kurz geschildert, bei einer Messung folgendermaßen:

Zuerst schiebt man den Schalter *S* (Abb. 1) nach links und schaltet dadurch den Apparat und gleichzeitig die Beleuchtung des Kapillarelektrometers ein. Das Aufleuchten des Lämpchens *L* am *E* bildet also gleichzeitig ein selbsttätiges Signal für die Einschaltung des Apparats. Der Wechselschalter *W* steht auf seiner Anfangsstellung →*r*

(Abb. 3) und schaltet das Normalelement *NE* gegen den Akkumulator *MA* über das Elektrometer und die Meßbrücke.

Durch Verschieben des Schleifkontakts (*Schl*) sucht man unter gleichzeitigem kurzen kräftigen Tasten des Kurzschlußtasters *T* den

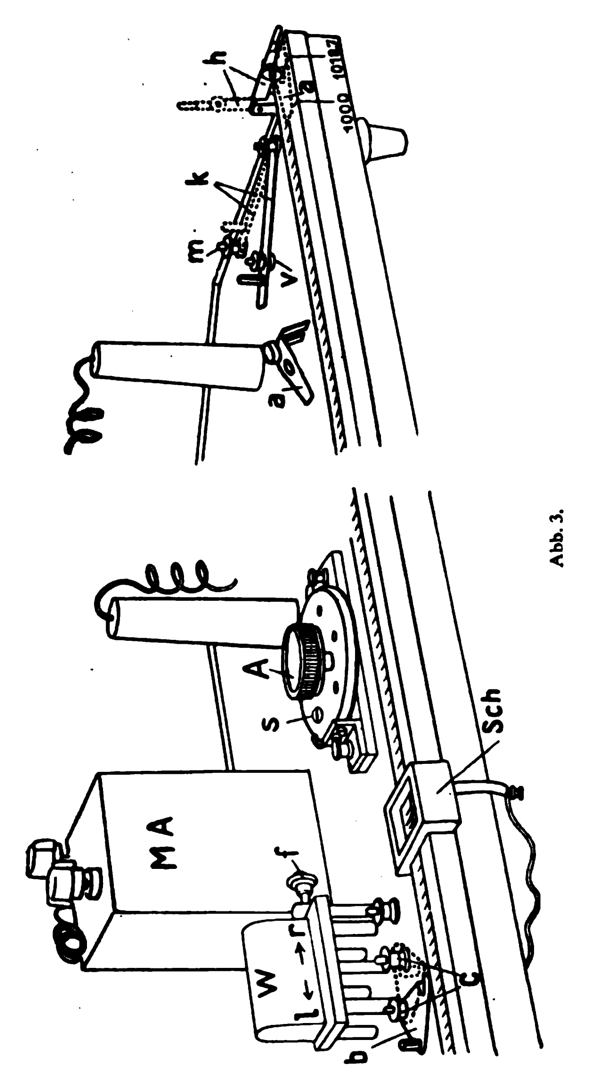


Abb. 3.

Punkt der Stromlosigkeit, der z. B. bei der Brückenablesung 51,20 cm liegen soll. Nun schiebt man den Wechselschalter *W* nach links (1 ←), schaltet damit an Stelle des Normalelements die Gaskette ein und sucht wieder den Punkt der Stromlosigkeit, der nach einer Reihe von

im Abstand von 5 Minuten wiederholter Messungen schließlich konstant bei 24,86 cm liegen mag. Nach jeder Messung schiebt man den Schalter *S* kräftig nach rechts, wobei gleichzeitig immer auch der Wechselschalter auf die Stellung Cadmium - Normalelement - Akkumulator geschoben wird, und das Lämpchen erlischt.

Die Berechnung der EMK der Gaskette erfolgt nach der Gleichung:

$$\text{EMK}_{\text{Gaskette}} = 1{,}0187 \cdot \frac{\text{Ables. Akk.-Gaskette}}{\text{Ables. Akk.-Normalelement}}$$

$$\text{also} = 1{,}0187 \cdot \frac{24{,}86}{51{,}20} = 0{,}4855 \text{ Volt.}$$

Diese Berechnung hat man nicht nötig, wenn man sich der vorher erwähnten Vorrichtung zum direkten Ablesen der Millivolt bedient. Will man mit dieser arbeiten, so verfährt man folgendermaßen: Der Kontaktwinkel *a* wird von der Meßbrücke entfernt und der auf 1018 mm eingestellte Kontakthebel *h* heruntergeklappt. Der Kontaktstreifen *k* wird von der Klemme *m* auf die Klemme *v* herübergedreht, ferner wird das Kontaktblech *b* so gedreht, daß die Verbindung zwischen der Klemme *c* gelöst ist (Abb. 3).

Durch diese Umschaltungen hat man die Meßbrücke durch einen auf der Trommel *A* liegenden Meßdraht (Abgleichwiderstand) verlängert, ferner für die rechte Stellung des Wechselschalters (Akkumulator-Normalelement) den Schleifkontakt *Schl* automatisch ausgeschaltet. Beim Einschalten des Stromes durch Linksvorschiebung des Schalters *S* hat man unter Tasten des Kurzschlußtasters nunmehr nur die Trommel *A* so lange zu decken, bis Stromlosigkeit eingetreten ist. Da der Kontakthebel *h* dabei auf dem Teilstrich 1018 m (entsprechend der Spannung des Normalelements = 1018 Millivolt) steht, entspricht bei der zweiten Messung der Gaskette gegen Akkumulator jetzt jeder abgelesene Millimeter einem Millivolt. Für das vorherige Beispiel finden wir also jetzt bei der Ablesung Gaskette—Akkumulator (Linksverschiebung des Wechselschalters *W*) Stromlosigkeit bei Teilstrich 485,5, somit ist die EMK der Gaskette = 485,5 Millivolt.

Aus der Millivoltzahl gelangt man zum p_H, indem man unter Berücksichtigung der Temperatur das Potential der Kalomelelektrode gegen die N-Wasserstoffelektrode subtrahiert und diese Differenz durch den aus der *Nernst*schen Gleichung resultierenden Faktor dividiert. Die Werte sowie eine eventuelle Berücksichtigung des Barometerstandes mögen aus Tabellen ersehen werden.

Mißt man anstatt mit der Wasserstoffelektrode mit der Chinhydronelektrode, so muß man beachten, daß die Chinhydronelektrode als positiver Pol an Stelle der Kalomelelektrode, diese aber als negativer Pol an Stelle der Wasserstoffelektrode geschaltet werden muß, sonst

wird genau wie vorher bei der Messung verfahren. Ergibt sich eine EMK der Kette Chinhydronelektrode—gesättigtes KCl—gesättigte Kalomelelektrode $\varepsilon = 0{,}1154$ Volt, so ist

$$p_H = -\frac{\varepsilon}{q} + \gamma,$$

wobei q der *Nernst*sche Faktor (0,0577 bei 18⁰) und γ ein von der Temperatur abhängiger Wert (bei 18⁰) = 7,80), der die Reduktion auf die Normalwasserstoffelektrode enthält, ist. Es ist also in dem Beispiel:

$$p_H = -\frac{0{,}1154}{0{,}0577} + 7{,}8 = -2{,}00 + 7{,}80 = 5{,}80.$$

Die Herstellung des Apparats wurde der Firma F. und M. Lautenschläger, G. m. b. H., München, übertragen. Nach Abstellung der sich am Anfang ergebenden Mängel arbeitet der Apparat seit einer Reihe von Monaten einwandfrei. Der Vorteil einer stets gebrauchsfertigen Apparatur und die schnelle, einfache Handhabung verkürzen die zur Messung notwendige Zeit sehr erheblich, so daß die Bestimmung der $(H^{\cdot})$ nun auch in solchen Fällen erfolgen kann, wo man sich bisher mit anderen, weniger genauen Untersuchungsmethoden begnügte.

Über die chemische Zusammensetzung der lebenden Materie.

Von

W. W. Lepeschkin.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Prag.)

(Eingegangen am 18. Februar 1926.)

Einleitung.

Die stoffliche Grundlage der lebenden Organismusteile bezeichnete man bis jetzt gewöhnlich als lebende Substanz. In dem vorliegenden Aufsatz habe ich diesen Ausdruck vermieden, weil die lebenden Organismusteile nicht aus einer einheitlichen, sondern aus mehreren oder vielen chemisch individualisierten Substanzen bestehen. Andererseits müssen diese Substanzen sich in einer bestimmten Anordnung befinden, um das Leben zu ermöglichen. Es ist also gerechtfertigt, von der chemischen Zusammensetzung einzelner lebender Zellbestandteile zu sprechen, die ich im allgemeinen als „lebende Materie" bezeichnete[1]). Von den verschiedenen Arten dieser Materie sind das Protoplasma, der Zellkern und die Chromatophoren der Pflanzen diejenigen, deren lebende Natur zurzeit allgemein anerkannt ist, während die anderen Arten dem morphologischen Studium gewöhnlich wenig zugänglich sind und keine allgemeine Anerkennung als lebende Zellgebilde erworben haben[2]). Unsere chemischen Betrachtungen beziehen sich also nur auf das Protoplasma, den Zellkern und die Chromatophoren der Pflanzen.

Wie ich vor kurzem gezeigt habe (l. c.), haben diese Zellbestandteile eine kolloidale Struktur und verhalten sich so gegen mikrochemische

---

[1]) Vgl. meine Kolloidchemie des Protoplasmas 1924, S. 3.

[2]) Manche Forscher, wie z. B. *Haidenhain* (Plasma und Zelle), halten nicht nur die Zellbestandteile, sondern auch die Interzellularsubstanz der Tiere für lebend, weil sie einen Stoffwechsel, Wachstum und sogar Vermehrung zeigen. Es sei jedoch darauf aufmerksam gemacht, daß leblose Substanzen, z. B. die aus Cellulose bestehenden Zellwände der Pflanzen, wenn sie sich unter stetigem Einfluß der lebenden Materie befinden, Lebenserscheinungen zeigen können (vgl Kolloidchemie des Protoplasmas, S. 1 und 2).

Reagenzien, daß man vermuten darf, daß an ihrem Aufbau lockere chemische Verbindungen der Eiweißkörper mit Lipoiden beteiligt sind. Die chemische Zusammensetzung der lebenden Materie interessierte mich aber damals nur insofern, als sie mir die kolloidale Struktur derselben erklärte. In diesem Aufsatz möchte ich aber die genannten Arten der lebenden Materie von einem rein chemischen Standpunkt aus betrachten und versuchen, gemeinsame Eigentümlichkeiten ihrer chemischen Konstitution aufzudecken.

1. Produkte der chemischen Zersetzung des lebenden Protoplasmas.

Bekanntlich sterben alle lebenden Bestandteile der Zelle bei der Einwirkung chemischer Reagenzien ab, die bei der chemischen Analyse verwendet werden und chemische Veränderungen der lebenden Materie hervorrufen. Nach den üblichen chemischen Methoden können wir also nur leblose Zellbestandteile untersuchen. Es ist aber klar, daß leblose Substanzen, die das tote Protoplasma usw. zusammensetzen, von den Substanzen des lebenden Protoplasmas usw. herstammen und also als Produkte seiner chemischen Zersetzung betrachtet werden können. Diese Produkte möchten wir jetzt näher betrachten.

Das Protoplasma ist bis jetzt nur wenig untersucht worden, und eine vollständige chemische Analyse wurde nur von *Reinke*[1]) an Plasmodien der Myxomyceten und von *Lilienfeld*[2]) an Leucocyten gemacht. Neuerdings habe auch ich über die chemische Analyse des Plasmodiums von Fuligo varians kurz berichtet[3]). Außerdem ist die chemische Zusammensetzung der kernlosen Erythrocyten bekannt, die ausschließlich aus dem Protoplasma bestehen, weil ihre Pellicula nur außerordentlich dünn ist und als verdichtetes Protoplasma betrachtet werden kann[4]).

Als *Reinke* eine chemische Analyse des Plasmodiums unternahm (1881), kannte man nur wenig von der chemischen Konstitution der Eiweißkörper, die erst später als aus Aminosäuren zusammengesetzte Verbindungen angesehen wurden. Die Konstitution von Nucleinen und Nucleoproteiden, die bekanntlich erst von *Kossel* (1894) gründlich untersucht wurden, war zur Zeit *Reinkes* ebenfalls unbekannt. Es ist also vollkommen begreiflich, daß *Reinke* sich mit der Elementaranalyse eines durch verdünnte Kalilauge, Salzsäure, Äther und Alkohol erschöpften Preßrückstandes des Plasmodiums und mit der Bestimmung der Lipoide (Cholesterin, Harze, Fette) und der wichtigsten in den Preßsaft übergegangenen kristallinischen Substanzen

---

[1]) *Reinke*, Unters. aus d. bot. Laboratorium Göttingen 1881 bis 1883. Einleitung in die theoretische Biologie. Berlin 1911.

[2]) *Lilienfeld*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 473, 1894.

[3]) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 41, 179, 1923.

[4]) Vgl. meinen Aufsatz in „Biologia generalis“ 1, H. 7, 1925 (Wien, Verlag Emil Haim): „Rote Blutkörperchen im Lichte der Kolloidchemie“.

(Xanthinbasen, Aminosäuren u. a.) begnügte. Außerdem stellte er die Menge von Wasser und Mineralstoffen im Plasmodium fest.

Die Elementaranalyse des erwähnten Preßrückstandes, der von *Reinke* als *Plastin* bezeichnet wurde, ergab einen zu kleinen Stickstoffgehalt (ungefähr 12 Proz.) im Vergleich mit dem der Eiweißkörper (16 bis 18 Proz.). Infolgedessen schloß *Reinke*, daß das Plastin, „diese unter den Bestandteilen des Protoplasmas vielleicht wichtigste Verbindung, entweder den Eiweißstoffen sehr nahe“ zu stehen oder „eine Annäherung an das relativ stickstoffarme Nuclein“ zu zeigen scheine.

Da aber das Plastin auch ziemlich viel (2,15 Proz.) Phosphor enthielt, vermutete *Reinke*, daß es vielleicht eine Verbindung eines typischen Eiweißstoffes mit einer organischen Phosphorverbindung sei. Das calciumcarbonatfreie, lufttrockne Plasmodium enthielt ungefähr 40 Proz. Plastin, obwohl seine Menge nur sehr annähernd nach dem Stickstoffgehalt berechnet wurde.

Außer dem Plastin enthält das Plasmodium, nach *Reinke*, eine unbedeutende Menge in Wasser löslicher Eiweiße. Nach dem Verreiben des Plasmodiums mit einer 10proz. Lösung von NaCl geht aber eine bedeutende Menge von „Vitellin“ in Lösung.

Die Analyse, welche *Lilienfeld* an Leucocyten gemacht hat, wurde unter einer ständigen Aufsicht von *Kossel* und nach den Methoden desselben ausgeführt und gibt ein vollständiges Bild der chemischen Zusammensetzung der Leucocyten. Diese enthalten, nach *Lilienfeld*, 68,78 Proz. trockener Substanz an Nuclein und 8,67 Proz. an Histon, die in den Zellen zu Nucleohiston und Nucleoproteid verbunden sind. Da Nucleohiston, nach moderner Terminologie ebenfalls als Nucleoproteid bezeichnet werden muß, so sind also in der trockenen Substanz der Leucocyten 77,45 Proz. Nucleoproteide vorhanden.

Der Rest besteht, nach *Lilienfeld*, aus Lipoiden (Cholesterin 4,4 Proz., Lecithin 7,51 Proz., Fette 4,02 Proz.), Eiweiß und Glykogen (1,76 und 0,8 Proz.). Da die Leucocyten, nach demselben Verfasser, meist einkörnige Zellen sind, in denen die Masse des Kernes diejenige des Cytoplasmas übertrifft, so ist vielleicht der Gehalt von Nucleoproteiden im Protoplasma selbst nicht so bedeutend, wie der der ganzen Zelle. Jedenfalls kann aber dieser Gehalt nicht unter 65 bis 70 Proz. sein.

Was nun kernlose Erythrocyten anbelangt, so enthält ihre trockene Substanz ungefähr 95 Proz. Hämoglobin, d. h. ein Proteid; der Rest besteht aus Lipoiden (Lecithin, Cholesterin) und Eiweiß.

Sosnowski[1]), der eine teilweise Analyse des Protoplasmas von Paramaecium caudatum unternahm, gibt ebenfalls an, daß dasselbe keine genuinen

---

[1]) *Sosnowski*, Beitr. z. Chemie d. Zelle, Zentralbl. f. Physiol. 13, 267, 1900.

Eiweißkörper (also Proteine) enthält. Es sollen dagegen ungefähr 50 Proz. Protoplasmasubstanz in Lösung gehen, wenn ihre Masse der Behandlung von 0,2 proz. kaustischem Alkali oder einer 0,3proz. Sodalösung unterworfen wird. Beim Ansäuern mit Essigsäure fiel, im Versuche des genannten Autors, das Gelöste vollständig aus, gab Biuretreaktion, war phosphorhaltig und zeigte beim Kochen mit Phloroglucin und Salzsäure den für Pentosen charakteristischen Streifen. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß auch das Protoplasma von Paramaecium hauptsächlich aus Proteiden zusammengesetzt ist.

Beachten wir die zuerst von *Hartig* und *Sachs* betonte Tatsache, daß das Protoplasma der Pflanzen bei mikrochemischen Untersuchungen sehr oft nicht direkt gewöhnliche Eiweißreaktionen gibt, und daß, nach *Loew*[1]), das in Kalilauge gelöste Plastin *Reinkes* nach Ausfällung mit Essigsäure gewöhnliche Eiweißreaktionen gibt, so kommen wir zu dem Schluß, daß in allen untersuchten Fällen freie Eiweiße (Proteine) am Aufbau des Protoplasmas nicht beteiligt sind; das letztere enthält dagegen Eiweißverbindungen (Proteide) stets in großer Menge, und oft besteht es aus diesen Verbindungen beinahe vollkommen.

Im Falle der Leucocyten sind diese Verbindungen Nucleoproteide, d. h. Verbindungen von Proteinen (gewöhnliche Histonen und Protaminen) mit Nucleinsäuren. Bei Erythrocyten sind sie Hämoglobine, d. h. Verbindungen von Proteinen (Globinen) mit Hämatin.

Außerdem enthält das Protoplasma in allen untersuchten Fällen eine bedeutende Menge Lipoide (d. h. hauptsächlich Phosphatide, Sterine, Fette).

In diesem Aufsatz möchte ich einige Resultate der chemischen Analyse des Plasmodiums von Fuligo varians besprechen, die ich vor kurzem in der oben zitierten Arbeit zum Teil mitgeteilt habe.

2. Produkte der chemischen Zersetzung des Protoplasmas von Fuligo varians.

Zur chemischen Analyse gebrauchte ich die Plasmodien von Fuligo varians, die sich auf Kieferstümpfen entwickelt hatten und sich in junge Fruchtkörper zu verwandeln im Begriff waren. Unter dem Mikroskop zeigte sich das innere Protoplasma des Plasmodiums als ein zähflüssiger Körper, der in Wasser und schwachen Zuckerlösungen sich zu Kugeln abrundete. Das peripherisch gelagerte Protoplasma hatte die Konsistenz einer Emulsionsgallerte[2]), die bei der Abfertigung des mikroskopischen Präparats zähflüssig wurde. Überall waren im Protoplasma Vakuolen zerstreut.

---

[1]) *O. Loew*, Bot. Ztg. 1884, S. 113.

[2]) Vgl. meine „Kolloidchemie des Protoplasmas", S. 28 bis 29. Berlin 1924.

Die Anzahl und das Volumen der Kerne (an den gefärbten Präparaten) ließen voraussetzen, daß das Volumen der Kernmasse nicht mehr als 10 Proz. der Gesamtmasse des Plasmodiums ausmachte.

Das Austrocknen (bei 130° C) der zur Analyse verwendeten Plasmodiumproben zeigte, daß das Plasmodium eine sehr große Wassermenge enthält. Diese Menge wurde, je nach der Feuchtigkeit der Luft, der Niederschläge usw. zu 79,3 bis 80,0 Proz. ermittelt. Nach *Reinke* ist der Wassergehalt des Plasmodiums 71,6 Proz. Den von ihm erhaltenen kleineren Wert kann man dadurch erklären, daß das Versuchsmaterial *Reinkes* sich auf dem Lohehaufen einer Gerberei entwickelt hatte und deshalb eine sehr große Kalkmenge enthielt (ungefähr 27 bis 41 Proz. $CaCO_3$ im luftrockenen Plasmodium, l. c., S. 14), während meine Plasmodien sich auf dem Holze der Kieferstümpfe entwickelt haben und kalkarm waren. Die trockene Substanz des Plasmodiums *Reinkes* war also bedeutender.

Das Wasser des Plasmodiums ist zum Teil im Protoplasma gelöst, zum Teil bildet es aber Vakuolen, die nach der Sättigung des letzteren mit Wasser entstehen[1]). Alle wasserlöslichen Substanzen des lebenden Plasmodiums sind also offenbar entweder in dem das Protoplasma durchtränkenden Wasser gelöst oder in den Vakuolen gespeichert. Das Protoplasma stellt aber keine Lösung verschiedener Substanzen in Wasser dar, die von Außen- und Innenflüssigkeit durch eine „Plasmahaut" abgetrennt ist, sondern es ist als eine organische Flüssigkeit, in der Wasser gelöst ist, aufzufassen. Infolgedessen spielen wasserlösliche Stoffe am Aufbau des Protoplasmas wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle und sind meist Abbauprodukte.

Obwohl nicht ausgeschlossen ist, daß in gewissen Fällen die Hauptmasse der Protoplasmastoffe beim Absterben zu wasserlöslichen Stoffen zersetzt wird (so z. B. bei Erythrocyten), sind diese Stoffe jedenfalls kompliziert gebaute Körper mit großen Molekülen (z. B. Hämoglobin). Im Gegensatz dazu besteht der wasserlösliche Anteil des Plasmodiums von Fuligo varians fast ausschließlich aus einfacheren organischen Stoffen (14,5 Proz. Glykose, 20 Proz. Aminosäuren, Purinbasen usw.) und organischen Salzen (2,2 Proz.), während er nur 2,2 Proz. Eiweißkörper enthält[2]). Im Falle des Plasmodiums besteht also der wasserlösliche Teil sicher nur aus Abbau- und Stoffwechselstoffen. Der Sitz der Lebensfähigkeit befindet sich aber offenbar nur im in Wasser unlöslichen Anteil des Plasmodiums.

Da die Menge der wasserlöslichen organischen Stoffwechselprodukte offenbar variieren kann, ist auch die Menge des in Wasser unlöslichen Anteils des Plasmodiums bei verschiedenen Individuen ungleich. Sie

---

[1]) Vgl. meine Aufsätze in „Biologia generalis" 1, Wien, E. Haim, 1925; in Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1926 und auch Kolloidchemie des Protoplasmas, S. 143. Berlin 1924.

[2]) Meine Aufsätze in Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1923, S. 181.

war in meinen Versuchen 52 bis 65 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums. Als Ausnahme wurden sogar in einem Plasmodium nur 49,5 Proz. des Trockengewichts in Wasser unlöslicher Stoffe gefunden. In diesem Falle enthielt aber das Plasmodium besonders viel Wasser (89,5 Proz.).

Bei der chemischen Untersuchung des in Wasser unlöslichen Anteils des Plasmodiums muß man beachten, daß dasselbe aus kolloidalen Stoffen besteht, welche ihre kolloidalen Eigenschaften bei der Einwirkung der gebräuchlichen Reagenzien verändern können. Es ist z. B. bekannt, daß in reinem Wasser unlösliches Globulin nach Behandlung mit Alkohol auch in Salzlösungen unlöslich wird. Nach Behandlung mit Alkohol und Austrocknen büßen manche Eiweißkörper sogar ihre Löslichkeit in schwachen Alkalien ein usw. Zur chemischen Untersuchung des Plasmodiums eignet sich also das Alkoholmaterial nicht. Deswegen habe ich ausschließlich entweder lebende oder durch solche abtötend wirkende Stoffe konservierte Plasmodien verwendet, die kolloidale Eigenschaften der Plasmodiumsubstanzen nicht verändern. Da in meinen Versuchen der Stammort der Plasmodien vom Untersuchungsort entfernt war und da die Behandlung mit Wasser oder Salzlösungen mehrere Stunden verlangte, setzte ich zum Wasser, in dem das Plasmodium aufgeschwemmt war, 0,02 Proz. Thymol und in einigen Fällen 6 Proz. Alkohol oder 4 Proz. Äther zu. Diese Konzentration bewirkt keine merkliche Denaturation der Eiweißkörper bei Zimmertemperatur, genügte aber vollkommen, um die Fäulnis zu hemmen und das Protoplasma abzutöten.

Am Stammort der Plasmodien hatte ich außerdem ein kleines Laboratorium, das mir gestattete, die entnommenen Plasmodiumproben genau abzuwägen und den Wassergehalt der Proben zu bestimmen. Um die Oxydation der Plasmodiumstoffe zu vermeiden, wurden die in Wasser aufgeschwemmten Plasmodiumproben in kleinen Fläschchen mit geschliffenen Propfen aufbewahrt.

Nach der Behandlung der Plasmodiumproben mit Wasser wurden diese, immer in feuchtem Zustande, der weiteren Behandlung der Reagenzien unterworfen; der wasserlösliche Teil des Plasmodiums wurde durch Abdampfen des Filtrats und durch Abwägen des ungelösten Restes (nach Abtrocknen im Vakuum) bestimmt.

Ich führe hier die in einem meiner Versuche erhaltenen Zahlen an. Das Gewicht der Plasmodiumprobe war 7,1960 g. Wassergehalt des betreffenden Plasmodiums 88,2 Proz. Wasserlösliche Stoffe (ausgetrocknet im Exsikkator) 0,2956 g, d. h. 34,76 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums. Der in Wasser unlösliche Teil macht also 65,24 Proz. des Trockengewichts.

Der in Wasser unlösliche Anteil des Plasmodiums entsprach in meinen Versuchen dem Plastin *Reinkes* + Lipoide (Fette, Fettsäuren,

Phytosterin, Phosphatide). Um die Menge von Plastin festzustellen, habe ich den in Wasser unlöslichen Anteil des Plasmodiums dem Austrocknen und der Extraktion mit Alkohol-Äther unterworfen. Die Menge der erhaltenen Lipoide variierte (im Trockengewicht des Plasmodiums) zwischen 7 und 14 Proz. [Fette + Fettsäuren 3 bis 10 Proz., Phytosterin 2,4 bis 5,5 Proz. und Phosphatide 0,7 bis 2 Proz.[1])]; die Menge des Plastins war in vier Versuchen folgerecht: 57,6, 49,7, 44,7 und 39,8 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums. Dieses Plastin enthielt jedenfalls noch Mineralsalze, die durch Verbrennen festgestellt waren und deren Menge zwischen 2,1 und 2,5 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums variierte. Wenden wir uns nun zur näheren chemischen Untersuchung des Plastins.

8. Chemische Zusammensetzung des „Plastins".

Die Elementaranalyse von Plastin wurde, wie erwähnt, von *Reinke* gemacht. Der von ihm gefundene zu niedrige Stickstoffgehalt dieser Substanz wurde neuerdings von *Iwanoff* bestätigt[2]). Daß sie aber eine Eiweißverbindung darstellt, folgt schon aus den oben erwähnten Angaben von *Loew*. Die Proteidnatur von Plastin wird auch durch die Einwirkung von Trypsin auf durch Alkohol-Äther extrahierte Plasmodien bestätigt. Nach *Walter*[3]) sollen solche Plasmodien von Trypsin vollkommen verdaut werden. Mit Pepsin-HCl bleibe aber die Verdauung unvollständig. Die Verdauung dauerte in den Versuchen *Walters* 24 bis 48 Stunden; das Verhalten des Plasmodiums erinnert also an das der Nucleoproteide, die ebenfalls bei einer verhältnismäßig kurzen Dauer der Verdauung nur teilweise gelöst werden, während sie von Trypsin vollkommen verdaut werden.

Meine Versuche zeigten, daß Plastin aus zwei Stoffgruppen besteht, die sich voneinander durch ihre verschiedene Beständigkeit gegen Reagenzeinwirkungen unterscheiden. Die eine, größere Stoffgruppe (ungefähr 36 bis 52 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums), löst sich in 1proz. Kalilauge (nach der Extraktion mit Alkohol-Äther), in 5proz. H_2SO_4 beim Kochen und in Pepsin-Salzsäure bei einer lange dauernden Verdauung (Pepsin, 1 Proz., HCl, 0,4 Proz., Temperatur 28° C, keine vorherige Behandlung mit Alkohol-Äther). Die zweite, kleinere Stoffgruppe (3,1 bis 7,5 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums) löst sich dagegen nicht in den angeführten Reagenzien. Um die chemische Zusammensetzung des größeren Anteils des Plastins zu erforschen,

---

[1]) Vgl. meinen oben zitierten Aufsatz in Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1923, S. 186.

[2]) *N. Iwanoff*, diese Zeitschr. 162, 444, 1925.

[3]) *H. Walter*, ebendaselbst 122, 90, 1921.

habe ich seine Hydrolyse mit 5proz. H_2SO_4 bei 100° C am Rückflußkühler unternommen.

17,720 g des durch Thymol abgetöteten Plasmodiums wurden mit Wasser extrahiert, auf einem abgewogenen Filter gesammelt und im Exsikkator ausgetrocknet. Der trockene Rückstand, der 1,4110 g wog, wurde mit Alkohol-Äther extrahiert, wobei sich 0,3488 g Lipoide (d. h. Fette, Phytosterin, Phosphatide) in Lösung gingen. Da das Plasmodium 85,7 Proz. Wasser enthielt, betrug das Plastin 1,0622 g oder 41,9 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums. Dieses Plastin wurde 48 Stunden mit 5proz. Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht, die Flüssigkeit heiß filtriert und auf dem Wasserbad abgedampft (um die Hydrolyse zu vervollkommnen), dann wieder mit heißem Wasser verdünnt und mit heißer Barytlösung versetzt, bis Schwefelsäure entfernt war. Die Flüssigkeit wurde durch heiße Filtration vom entstandenen $BaSO_4$ befreit und abgekühlt[1]). Nach dem Erkalten setzten sich sternförmig gruppierte kleine Blättchen von Kristallen ab, die, auf einem abgewogenen Filter gesammelt, 0,0482 g ausmachten und sich als *Thymin*kriställchen erwiesen. Ihre Lösung gab nach Versetzen mit $AgNO_3$ beim vorsichtigen Zusatz von Ammoniak einen in überschüssigem Ammoniak löslichen voluminösen Niederschlag; sie gab keinen Niederschlag mit Phosphorwolframsäure. Der Schmelzpunkt der Kristalle war 318 bis 322° (unter Gasentwicklung). Die etwas saure Lösung der Hydrolyseprodukte, die mit Bleiessig keine Trübung gab, wurde mit Phosphorwolframsäure versetzt, bis der Niederschlag noch entstand. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit Baryt etwas alkalisch gemacht. Der Überschuß von Baryt wurde von H_2SO_4 entfernt und die Flüssigkeit (nach Filtration) eingeengt und abgekühlt[1]): reichliche Kristallbildung. Außer *Thymin* sind zwischen den Kristallen auch Nadeln von *Uracil* gefunden worden. Die Menge der kristallinischen Masse (auf der Nutsche abgesaugt und getrocknet) wurde zu 0,1334 g bestimmt. Die Anwesenheit von Uracil wurde durch *Weidels* Reaktion festgestellt. Die Gesamtmenge von *Thymin* und *Uracil* war also 0,1816 g.

Der Wolframsäureniederschlag wurde durch Baryt zersetzt, der Überschuß desselben durch Schwefelsäure entfernt und die Flüssigkeit klar filtriert. Zum schwach sauren Filtrat wurde Silbernitratlösung zugesetzt, der Niederschlag der Purinbasen abfiltriert, durch HCl zerlegt, das neue Filtrat bis zur Trockne abgedampft (HCl entfernt) und der Rückstand in heißem Wasser gelöst. Da die erhaltene Lösung kein Guanin (keine Trübung mit NH_3) und kein Adenin (mit Natriumpikrat geprüft) enthielt, wurde sie mit Silbernitrat vermischt und aus den abgesetzten Silberverbindungen *Xanthin* und *Hypoxanthin* erhalten. Die Gesamtmenge dieser Basen war 0,0376 g. Das Filtrat von den Silberverbindungen der Purinbasen wurde nach *Kossel* und *Kutscher* mit Silbernitrat und Barytwasser behandelt, der Niederschlag (mit Barytwasser angerieben, an einer Nutsche abgesogen und gewaschen) wurde mit HCl zersetzt, die abfiltrierte Flüssigkeit bis zur Trockne abgedampft und die auskristallisierten Basen abgewogen. Ihre Menge war 0,2062 g. Sie wurden in heißem Wasser gelöst

[1]) Um den Verlust der Hydrolyseprodukte durch Adsorption zu vermeiden, wurden in allen meinen Versuchen die Niederschläge von Bariumsulfat (bzw. Bariumwolframat) stets in angesäuertem Wasser ausgekocht und das Waschwasser abgedampft und mit dem Filtrat vereinigt.

und *Cytosin* durch Natriumpikrat niedergeschlagen. Cytosinpikrat wurde durch HCl zerlegt und nach Entfernung von Pikrinsäure durch Benzol wurde *Cytosinchlorid* in kristallinischer Form abgewogen. Seine Menge war 0,0487 g, was 0,0368 g freier Base entspricht. Die Menge der Chloride von *Arginin* und *Histidin* war also 0,1294 g, was ungefähr 0,064 g freier Basen entspricht. Die Basen wurden im weiteren qualitativ geprüft. Im Filtrat von Silberverbindungen von Histidin, Arginin und Cytosin wurden 0,0530 g Lysin, abgewogen als Pikrat, gefunden, was 0,029 g freier Base entspricht.

Das Abwägen des Rückstandes des Plastins nach der Hydrolyse mit Schwefelsäure (48 Stunden, vgl. S. 133) zeigte, daß 0,5950 g des Plastins dabei gelöst waren. Wir sahen, daß der gelöste Teil 0,1816 g Uracil und Thymin, 0,0376 g Xanthin und Hypoxanthin, 0,0368 g Cytosin, 0,064 g Arginin und Histidin und 0,029 g Lysin, also 0,349 g Purin-, Pyrimidin- und Hexonbasen enthielt. Der Rest (ungefähr 0,28 g) bestand zum Teil aus Phosphorsäure und Kohlehydraten, zum Teil war er aber offenbar von Niederschlägen adsorbiert. Bezeichnen wir alle Verbindungen von Proteinen (Eiweißen) mit Nucleinsäuren als Nucleoproteide[1]), nehmen wir mit *Kossel*[2]) an, daß die Abspaltung von Xanthinbasen eine charakteristische Eigenschaft derselben ist, und erinnern wir uns daran, daß am Aufbau der Nucleoproteide Histone oder Protamine teilnehmen, von denen die letzteren fast nur aus den Hexonbasen (Arginin, Histidin, Lysin) bestehen, so kommen wir zu dem Schluß, daß der durch die erste Hydrolyse gelöste Teil des Plastins aus Nucleoproteiden besteht.

Weitere Hydrolyse des ungelösten Rückstandes des Plastins mit 5proz. H_2SO_4 (48 Stunden) führte in meinen Versuchen zu einer neuen Auflösung seiner Substanz, wobei 0,229 g Stoffe in Lösung gingen. Die Lösung, die nach Entfernung von H_2SO_4 keine Trübung mit Bleiessig gab, wurde mit Phosphorwolframsäure versetzt (saure Flüssigkeit). Der entstandene Niederschlag war so unbedeutend, daß er nicht weiter untersucht werden konnte. Dagegen wurde im Filtrat 0,040 g Thymin gefunden (sternförmig angeordnete Kristalle, die sich nach Abdampfen und Erkühlen der Lösung absetzten und die, gelöst, mit $AgNO_3$ Niederschlag nach Zusatz von Barytwasser gaben). Die durch Abfiltrieren der Thymin-Kristalle erhaltene Lösung gab *Weidel*sche Reaktion nicht, so daß Uracil fehlte. Da die Lösung auch einen Niederschlag mit $HgNO_3$ gab, konnte man voraussetzen, daß sie Asparagin- oder Glutaminsäure enthielt. Phosphorsäure war ebenfalls reichlich vorhanden. Die Produkte der zweiten Hydrolyse bestanden also hauptsächlich aus Thymin. Weitere Hydrolyse mit 5proz. H_2SO_4 (48 Stunden) löste noch 0,022 g Plastin. Die Produkte der Hydrolyse konnten aber diesmal nur qualitativ untersucht werden. Sie enthielten Cytosin, Arginin, Histidin, Lysin (?), Monosaccharide und Phosphorsäure. Andere Aminosäuren und Basen konnten nicht entdeckt werden (keine Trübung mit $AgNO_3$ oder, nach Entfernung von H_2SO_4, mit Bleiessig, dagegen war *Weidel*sche Reaktion positiv).

Somit enthielten die Produkte der zweiten und dritten Hydrolyse nur Abbauprodukte der Nucleoproteide, die sich offenbar am schwierigsten zersetzten.

---

[1]) *Abderhalden*, Lehrb. d. physiol. Chem., 4. Aufl., I. T., 1920, S. 693.
[2]) *Kossel*, Verhandl. d. phys. Ges. Berlin 1891.

Der durch 5proz. H_2SO_4 hydrolysierbare Anteil von Plastin besteht nicht ausschließlich aus Nucleoproteiden, sondern er enthält eine verhältnismäßig kleine Menge von freien Nucleinsäuren, die im Gegensatz zu Nucleoproteiden des Plastins in 10proz. NaCl nicht löslich sind, und eine sehr kleine Menge Globulin.

Behandelt man das Plasmodium mit Wasser, 10proz. NaCl und unterwirft man den durch Alkohol-Äther extrahierten Rückstand der Einwirkung von 1proz. Kalilauge, so geht eine Substanz in Lösung, welche keine Biuret-, Millons- und Xanthoproteinreaktion, sondern mit α-Naphthol und H_2SO_4 einen violetten Ring und mit Bleiessig (nach Ansäuern mit Essigsäure) einen Niederschlag ergibt. Nach Abdampfen der angesäuerten Lösung bis zu einem kleinen Volumen scheidet sich ein Niederschlag aus, der keine Millon-, Xanthoprotein- und Biuretreaktion, dagegen α-Naphtholreaktion gibt. Dieser Niederschlag, im Vakuum ausgetrocknet, beträgt ungefähr 2½ Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums (also ungefähr 5 Proz. des Plastins). Seine Menge variiert aber bei verschiedenen Plasmodien. Globulin scheidet sich als ein unwägbarer Niederschlag beim Ansäuern der durch die Behandlung des Plasmodiums (das vorher mit Wasser extrahiert war) mit 10proz. NaCl erhaltenen Lösung mit Essigsäure aus. Seine Menge wurde zu etwa 1 Proz. des Plastins bestimmt.

Resumieren wir die Resultate der drei nacheinander folgenden Hydrolysen von Plastin mit 5proz. H_2SO_4, so kommen wir zu dem Schluß, daß der größte Teil dieser Substanz (0,846 g von 1,0622 g Plastin) hauptsächlich aus Nucleoproteiden besteht. Unter den Basen, die die letzteren aufbauen, spielt Thymin die Hauptrolle; weiter sind Uracil, Cytosin, Arginin, Histidin, Lysin, Asparagin- oder Glutaminsäure, Kohlehydrate und Phosphorsäure am Aufbau der Plastin-Nucleoproteide beteiligt. Arginin, Histidin und Lysin entstammen offenbar den Protaminen, die gemeinsam mit Nucleinsäuren die Nucleoproteide des Plastins bilden.

In Übereinstimmung damit fand *N. Iwanoff* (l. c.) bei der Hydrolyse des „Eiweißes", das er durch Extraktion des getrockneten und entfetteten Plasmodiums durch Salzsäure erhalten hatte, nur drei genannte Aminosäuren. Dieses „Eiweiß" wurde von *Iwanoff* aus dem Extrakte mit Phosphorwolframsäure niedergeschlagen (l. c., S. 445). Somit enthielt es nicht nur das von den Nucleoproteiden abgespaltene Protamin, sondern auch Cytosin und Purinbasen. Es ist also verständlich, daß *Iwanoff* aus 10 g „Eiweiß" nur 1,3827 g Hexonbasen erhalten konnte.

Was nun den durch 5proz. H_2SO_4 nicht hydrolysierbaren Teil des Plastins anbetrifft, der, wie oben erwähnt, auch in 1proz. KOH und Pepsin-Salzsäure nicht löslich ist, so wurde er in meinen Versuchen durch 30proz. H_2SO_4 hydrolysiert. Ich unterlasse hier die Beschreibung meiner diesbezüglichen Versuche, weil ich sie in meiner oben zitierten Arbeit ausführlich beschrieben habe[1]). Ich erlaube mir hier nur, daran

---

[1]) Vgl. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1923, S. 185.

zu erinnern, daß dieser Teil des Plastins („Plasmatin") aus Lipoproteiden zu bestehen scheint. Diese ließen sich in Phytosterin, Fettsäuren, Asparaginsäure (oder Glutaminsäure) und ein Kohlehydrat zerlegen.

Reinkes Plastin besteht also hauptsächlich aus Nucleoproteiden und Lipoproteiden, von denen die ersteren zum Teil (etwa 10 Proz. ihrer Gesamtmasse) von den Zellkernen herstammen. Seinen verhältnismäßig niedrigen Stickstoffgehalt kann man durch Anwesenheit der Lipoproteide, von viel Phosphorsäure (nach *Reinke* enthält das Plastin 2,15 Proz. P oder 4,8 Proz. P_2O_5), Kohlehydraten und stickstoffarmer Glutaminsäure (bzw. Asparaginsäure) erklären. Manche pflanzliche Nucleine, wie z. B. Gerstennuclein, enthalten ebenfalls wenig Stickstoff[1]), vermutlich dank der Anwesenheit von Asparagin- bzw. Glutaminsäure, die in den Pflanzen weit verbreitet sind. Nehmen wir an, daß Lipoproteide des Plastins („Plasmatins") von gleichen Mengen Asparaginsäure und stickstofflosen Substanzen (Phytosterin, Fettsäuren, Kohlehydrat) zusammengesetzt sind, und daß der in den oben beschriebenen Versuchen nicht quantitativ bestimmte Rest desjenigen Plastinteils, der durch 5proz. H_2SO_4 hydrolysiert wurde, ebenfalls aus gleichen Mengen Asparaginsäure und stickstofffreier Substanzen (Phosphorsäure, Kohlehydraten) besteht, so müssen wir den Stickstoffgehalt des Plastins gleich 12,3 Proz. setzen[2]). Dieser Gehalt wurde aber von *Reinke* zu 12 Proz. bestimmt.

Iwanoff nimmt den Stickstoffgehalt des Platins zu 10 Proz. an (l. c., S. 444); man muß aber betonen, daß sein Plastin eine größere Menge von Kohlehydraten enthielt (13,16 Proz. Monosaccharide wurden nach einer Hydrolyse gefunden, l. c., S. 447). Es ist möglich, daß diese Kohlehydrate nur zum Teil den Nucleoproteiden entstammen. Ihr anderer Teil dürfte im Plasmodium (bzw. Plastin) in Form von leicht hydrolysierbaren Polysacchariden (Gummi, Glykogen, Hemicellulose) anwesend sein, die als Stoffwechselprodukt aufzufassen wären und die für die Bildung der aus Cellulose bestehenden Zellwände der Sporen verwendet werden.

Im Plasmodium, das in meinen Versuchen analysiert wurde, waren die Kohlehydrate zum Teil in Zuckerform (bis 14,2 Proz., vgl. meinen oben zitierten Aufsatz) vorhanden, zum Teil aber mit Basen zu Nucleoproteiden verbunden, weil sie durch Pepsin bei einer langen Wirkungs-

---

[1]) *Petit*, C. r. 8, 995, 1893.

[2]) Thymin und Uracil enthalten im Mittel 21,5 Proz. N. Ihre Menge war 0,2216 g. Cytosin (0,0368 g) enthält 36 Proz. N; Xanthin und Hypoxanthin (0,0376 g) 35 Proz.; Arginin und Histidin (0,064 g) 28 Proz. N; Lysin (0,029 g) 17 Proz. N.; Asparaginsäure 10 Proz. N. Der nicht quantitativ bestimmte Rest der Hydrolyseprodukte wog 0,846 — 0,379 = 0,467 g, die Lipoproteide 0,216 g. Der mittlere Stickstoffgehalt des Plastins ist also (0,2216 . 21,5 + 0,0368 . 36 + 0,0376 . 35 + 0,064 . 28 + 0,029 . 17 + 0.467 . 5 + 0,216 . 5): 1,062 = 12,3 Proz.

dauer, gemeinsam mit Pyrimidin- und Purinbasen, in Form von Monosacchariden (oder ihrer Aminoabkömmlige) in Lösung gingen[1]). Wären sie auch in meinem Plasmodium als Polysaccharide vorhanden, so konnten sie durch Pepsin nicht gelöst werden.

Der verhältnismäßig niedrige Stickstoffgehalt des Plastins spricht also nicht gegen seine Proteidnatur. Sowohl Nucleoproteide als auch Lipoproteide, die dieses Plastin zusammensetzen, enthalten eine große Menge stickstofffreier Substanzen (Phosphorsäure, Kohlehydrate, Phytosterin), welche bekanntlich auch in anderen Nucleoproteiden und Proteinen nie fehlen.

Wie früher erwähnt, werden mit Wasser extrahierte Plasmodien (in feuchtem Zustande) durch Pepsin-Salzsäure bei einer 14tägigen Einwirkungsdauer zum großen Teil verdaut, so daß nur Lipoide und Lipoproteide („Plasmatin") zurückbleiben. Diese Tatsache widerspricht nicht der Voraussetzung, daß Plastin hauptsächlich aus Nucleoproteiden besteht, weil, wie ich schon in meiner oben zitierten Arbeit betont habe, seit *Hammarsten* bekannt ist, daß bei einer lange dauernden Verdauung das zunächst entstehende Nuclein gespalten und gelöst werden kann.

Bekanntlich werden Nucleoproteide zu Eiweiß und Nuclein schon unter Einwirkung von Kalilauge gespalten. Auf diese Weise habe ich aus Nucleoproteiden des Plastins ein Nuclein erhalten, das bei der Hydrolyse ein Histon (oder Protamin), Purin- und Pyrimidinbasen und Phosphorsäure lieferte (vgl. meine oben zitierte Arbeit, S. 183).

Auf Grund der mitgeteilten Tatsachen denke ich berechtigt zu sein, anzunehmen, daß der in Wasser unlösliche Anteil des Plasmodiums von Fuligo varians, wie der der Leucocyten, hautsächlich aus Nucleoproteiden besteht, an welche sich Lipoide, Lipoproteide, anorganische Salze und manchmal Polysaccharide anschließen. Der wasserlösliche Teil des Plasmodiums besteht hauptsächlich aus einfacheren organischen Verbindungen, die als Abbauprodukte der Nucleoproteide und Proteine aufzufassen sind. Wasserlösliche Eiweißkörper machen im Plasmodium nur einen sehr geringen Teil aus.

4. Gemeinsames in der Zusammensetzung des Protoplasmas und anderer Arten der lebenden Materie.

Wie aus den vorhergehenden Paragraphen hervorgeht, ist die chemische Zusammensetzung der drei untersuchten Arten des Protoplasmas, also die des Protoplasmas der Leucocyten, der roten Blutkörperchen und des Plasmodiums, insofern ähnlich, als in allen Fällen

---

[1]) Vgl. l. c., S. 183.

der größte Teil des Protoplasmas aus Proteiden, Lipoiden und Wasser besteht. Andererseits sind sowohl Proteide als auch Lipoide bei verschiedenen Protoplasmaarten aus verschiedenen Bausteinen gebaut. Man muß außerdem betonen, daß Nucleoproteide, die nach früheren Ansichten ausschließlich in den Zellkernen vorkommen, wie wir sahen, Hauptbestandteile des farblosen Protoplasmas darstellen, während Proteine, die in demselben nur in kleinen Mengen vorkommen, als Abbau- und Stoffwechselprodukte angesehen werden können. Die Proteide, die den Zellkern zusammensetzen, dürfen aber im allgemeinen den Proteiden des Protoplasmas auch in ein und derselben Zelle nicht gleich sein. So enthalten z. B. die Zellkerne der roten Blutkörperchen farblose Proteide. *Lilienfeld* (l. c.), der nicht nur das Protoplasma, sondern auch die Bestandteile der Zellkerne der Leucocyten untersuchte, fand in den Kernen Nucleoproteide, die denjenigen des Protoplasmas nicht gleich waren und daher von ihm mit einem besonderen Namen benannt wurden („Nucleohiston“).

Ich unterlasse hier eine ausführliche Besprechung der vorhandenen Literaturangaben betreffend die chemischen Bausteine der Zellkerne. Man findet solche Besprechung im Referat von *Zacharias*[1]) und im Buche von *A. Meyer*[2]). Ich möchte aber betonen, daß die in den Kernen gefundenen Nucleine, Nucleohistone, Nucleinsäurehistone usw., die als Hauptbestandteile der Kerne bezeichnet werden können, im allgemeinen zu den Nucleoproteiden gerechnet werden müssen, weil die letzteren Verbindungen der Proteine mit Nucleinsäuren darstellen. Außer Nucleoproteiden sind in den Kernen auch stets Lipoide anwesend, obwohl ihr Gehalt geringer als im Protoplasma zu sein scheint.

Was nun die chemische Zusammensetzung der Chromatophoren der Pflanzen anbelangt, so gab schon *Sachs* an, daß nach Extraktion der Chloroplasten mit Alkohol das zurückbleibende Gerüst Farbenreaktion von Eiweißkörpern gibt. Nach *Molisch* können Eiweißkörper in Chloroplasten ebenfalls mit den üblichen Reagenzien entdeckt werden[3]). Dasselbe geben auch *Lakon* und *Gertz* an[4]). *A. Meyer* (l. c.) bestätigte die Angaben von *Molisch*, so daß der Eiweißgehalt der Chloroplasten sichergestellt ist. Andererseits lassen sich in den letzteren auch Lipoide nachweisen.

---

[1]) Progressus rei botanicae 3, H. 1, S. 67, 1909.

[2]) Morpholog. und physiol. Analyse der Zelle 1, 510, 1920. Vgl. auch Ref. von *A. Pratje* in Biolog. Centralbl. 4, 88, 1920.

[3]) *Molisch*, Mikrochemie der Pflanzen 1913, S. 340; Zeitschr. f. Bot. 8, 131, 1916.

[4]) *Lakon*, diese Zeitschr. 18, 145, 1916; *Gertz*, Botanisk Notiser Lund 1917.

So konnte z. B. *Biedermann*[1]) diese Stoffe in Chromatophoren durch Schwärzung mit Osmiumsäure und auf anderem Wege nachweisen. Meine Versuche an Spirogyra zeigten, daß nach der Abtötung der Alge ihre Chloroplasten sehr gut mit Sudanfarbstoff gefärbt werden. Eine bedeutende Menge der Lipoide in den Chloroplasten kann auch durch den folgenden Versuch nachgewiesen werden.

Wasser eines Präparats von Spirogyra wird durch gesättigte Lösung von Äther in Wasser ersetzt, und nach dem Auflegen eines Deckgläschens wird das letztere an den Rändern mit Paraffin gedichtet. Nach einigen Stunden treten aus den Chloroplasten des abgetöteten Spirogyra kugelige Tropfen einer öligen Flüssigkeit, die durch Chlorophyll grün gefärbt ist. Äther löst sich offenbar in Lipoiden der Chloroplasten, sammelt sich in ihnen und vergrößert das Volumen der Lipoidphase, die zusammenfließt und aus den Chloroplasten heraustritt. Chlorophyll löst sich dabei in ihr, weil er nicht nur in Lipoiden, sondern auch in Äther gut löslich ist.

Lipoide werden, nach *Czapek*, in Chloroplasten am besten auch durch Sudan III, gemischt mit Amylenhydrat und Pyridin, nachgewiesen[2]).

Man kann also annehmen, daß die Hauptbestandteile der Chloroplasten aus Eiweißkörpern und Lipoiden besteht. Ob aber diese Eiweißkörper Proteide sind, kann selbstverständlich nur durch chemische Analyse der Chloroplasten entschieden werden.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß die organischen Produkte der chemischen Zersetzung der lebenden Materie durch schwach angreifende Reagenzien im allgemeinen ausschließlich oder wenigstens hauptsächlich aus Eiweißkörpern und Lipoiden bestehen. Unter Eiweißkörpern verstehen wir Proteide oder Proteine, unter Lipoiden Fette, Phosphatide und Sterine.

5. Chemische Zusammensetzung der lebenden Materie.

Da die lebende Materie unter Einwirkung der zur chemischen Analyse verwendeten Reagenzien abstirbt, so kann ihr chemischer Bau nur durch mildere physikalische Methoden erforscht werden. In meinen vor mehr als 10 Jahren publizierten Arbeiten[3]) habe ich schon darauf hingewiesen, daß diese Methoden uns den Unterschied zwischen der chemischen Zusammensetzung des lebenden und toten Protoplasmas auf das deutlichste zeigen.

Diese Methoden sind: Bestimmung der Permeabilitätsänderungen des Protoplasmas unter Einwirkung verschiedener Reagenzien, Vitalfärbung, Studium der Giftwirkung, Aggregatsänderung und Veränderung des mikroskopischen Aussehens des Protoplasmas beim Absterben.

---

[1]) *Biedermann*, Flora 11/12, 1918 N.F.; 13, H. 1/2, 1919.

[2]) *F. Czapek*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 27, 212, 1920.

[3]) Ebendaselbst 28, 91 und 383, 1910; 29, 255. 349, 1911; 30, 528, 1912; Kolloid-Zeitschr. 1913.

Bekanntlich verliert das Protoplasma nach dem Absterben seine selektive Permeabilität. Besonders demonstrativ ist diese Erscheinung an den Pflanzenzellen zu sehen, in denen nach dem Tode keine Plasmolyse möglich ist. Wasserlösliche Substanzen, deren Diffusion vom lebenden Protoplasma in hohem Grade gehemmt wird, diffundieren durch das tote Protoplasma rasch hindurch.

Das Absterben kann bekanntlich auch durch die Reagenzien hervorgerufen werden, die unter den Bausteinen des Protoplasmas nur Eiweißkörper chemisch verändern können, so z. B. durch schwache Sublimatlösungen, die auf Lipoide gar nicht einwirken. Außerdem wird das wasserhaltige Protoplasma schon durch eine verhältnismäßig schwache Temperaturerhöhung getötet, die Lipoide unverändert läßt und doch für die chemische Veränderung der Eiweißkörper (Denaturation) ausreicht[1]).

Andererseits sind Eiweißkörper nicht imstande, die Diffusion von Zucker und Salzen zu verhindern, weil sie diese Substanzen lösen und Salze sogar so festhalten, daß die Reste derselben durch Dialyse nicht entfernt werden können. Man hat also anzunehmen, daß die selektive Permeabilität des lebenden Protoplasmas durch Lipoide bedingt wird.

Diese Annahme wird bekanntlich dadurch bekräftigt, daß in Lipoiden gut lösliche Stoffe (Narkotica) durch das Protoplasma unvergleichbar schneller als Salze diffundieren. Da aber die selektive Permeabilität bei der chemischen Veränderung der Eiweißkörper vernichtet wird, müssen wir schließen, daß Lipoide sich im lebenden Protoplasma in einer so engen Vereinigung mit Eiweißkörpern befinden, daß eine schwache chemische Veränderung der letzteren die ersteren in einen Zustand versetzt, in dem sie nicht mehr die Diffusion der Salze und Zucker hindern können.

Daß Lipoide mit Eiweißkörpern im Protoplasma innig vereinigt sind, wird auch dadurch bewiesen, daß die Konzentrationen der Narkotica, welche ausreichen, um die Koagulation einerseits der Protoplasmaeiweißstoffe und andererseits der toten Eiweißkörper hervorzurufen, verschieden sind[2]). Je größer die Löslichkeit des Narkoticums

---

[1]) Darüber, daß die Denaturation der Eiweißkörper eine chemische Veränderung derselben unter Einwirkung von Wasser ist, vgl. meine Aufsätze in Biochem. Journ. 1922 und in Kolloid-Zeitschr. **31**, 4, 6, **1922**; **32**, 44 und 100, **1923**. Über die Einwirkung der hohen Temperatur auf das Protoplasma vgl. meinen Aufsatz: The constancy of the living Substance in Studies from the Laboratory of Plant Physiology of Charles university in Prague **1**, 1, 1923.

[2]) *W. Lepeschkin*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **29**, **259**, 1911. Vgl. auch Kolloidchemie des Protoplasmas, S. 151.

in Lipoiden ist, desto kleiner ist seine Konzentration, die bereits eine Koagulation der Protoplasmaeiweißkörper bewirkt, im Vergleich mit der Konzentration desselben Narkoticums, die die Koagulation einer Albuminlösung hervorruft.

Der dritte Beweis der innigen Vereinigung der Eiweißkörper mit Lipoiden im lebenden Protoplasma ist die Vitalfärbung der Zellen. Im allgemeinen kann man annehmen, daß die Grundmasse des lebenden Protoplasmas nur ausnahmsweise bei der Vitalfärbung und nur sehr schwach gefärbt wird. Gewöhnlich bleibt sie aber farblos, obwohl sich einzelne in ihm befindliche Körnchen intensiv färben. Nach dem Absterben färbt sich dagegen die Grundmasse des Protoplasmas nicht schwächer als die Körnchen. Der Versuch, solches Verhalten des Protoplasmas in der Weise zu deuten, daß die Farbstoffe im lebenden Protoplasma zu Leucokörpern reduziert, an bestimmten Orten desselben aber wieder reoxydiert werden, gelang nicht. Diese Erklärung läßt vollkommen unbegreiflich, weshalb tote Körper, die ins Protoplasma gelangen, sich gut färben. Die Versuche an Leucocyten zeigten z. B., daß tote Bakterien, die ins Protoplasma aufgenommen werden, Farbstoffe speichern. Lebende Bakterien aber, die sicher über ein Reduktionsvermögen verfügen, sich zunächst färben, um sich alsdann teilweise zu entfärben[1].

Andererseits ist bekannt, daß alle Eiweißkörper (sowohl Proteine als auch Proteide) Farbstoffe speichern[2]. Eiweißkörper vermögen auch in Lösungen Farbstoffe festzuhalten (adsorbieren oder chemisch binden), wie die Versuche von *Bechhold* zeigten, der eine durch Methylenblau gefärbte Eiweißlösung durch Gelatinefilter filtrierte und im Filtrat kein Methylenblau fand, obwohl es durch das Filter durchdrang, wenn es allein war.

Wenn die Grundmasse des Protoplasmas bei Vitalfärbung farblos bleibt (und das ist fast immer der Fall), müssen wir annehmen, daß ihre Eiweißkörper nicht frei sind. Da aber die bei Vitalfärbung färbbaren Körnchen nur einen geringen Teil des Protoplasmas ausmachen, haben wir zu schließen, daß das letztere im allgemeinen gewöhnlich keine freie Proteide enthält, die nur Stoffwechselprodukte sind.

Aber auch einige Lipoide, wie z. B. Lecithin, Rohcerebrosin, Wollpech und andere, speichern nach *Loewe* Methylenblau[3]. Andererseits zeigt das

---

[1]) *Haidenhain*, Plasma und Zelle 1, 462 bis 463.

[2]) Vgl. z. B. *A. Fischer*, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas 1899.

[3]) *S. Loewe*, Zur physikailschen Chemie der Lipoide. Diese Zeitschr. 127, 231 bis 240, 1922.

Protoplasma im Ultramikroskop keine Ultramikronen, während diese in Lösungen von Lipoiden, die eine mittlere Stellung zwischen hydrophoben und hydrophilen Kolloiden einnehmen, gut sichtbar sind[1]).

Wir haben also zu schließen, daß nicht nur Proteide, sondern auch z. B. Lecithin im lebenden Protoplasma nur in irgend einer gebundenen Form vorkommt.

Aus diesem Grunde nahm ich in den oben zitierten Arbeiten an, daß Proteide (Eiweißkörper) und Lipoide im lebenden Protoplasma miteinander chemisch verbunden sind. Die Verbindungen der genannten Substanzen sind aber offenbar unbeständig. Sie müssen unter dem Einfluß der chemischen Agenzien, die ihre Bestandteile chemisch angreifen, zerfallen. Aber auch unter dem Einfluß mechanischer Einwirkungen, die das Protoplasma abtöten, müssen sie dem Zerfall anheimfallen[2]). In dieser Beziehung erinnern sie offenbar an manche Sprengstoffe. Manche organischen Molekularbindungen, so z. B. die, welche neuerdings von *Staudinger* beschrieben sind[3]), sind ebenfalls sehr unbeständig und zerfallen unter Einwirkung eines Stoßes zu Bestandteilen. Gerade diese Empfindlichkeit für mechanische Einwirkungen veranlaßte mich zu schließen, daß Proteide und Lipoide im lebenden Protoplasma chemisch verbunden sind und nicht etwa Adsorptionsverbindungen bilden, wie man zunächst voraussetzen konnte. Obwohl auch Adsorptionsverbindungen sicher eine Art chemischer Verbindungen darstellen, zerfallen sie nie unter Einwirkung mechanischer Einflüsse.

In dem Falle, wo einer der chemisch reagierenden Körper unvergleichbar größere Moleküle im Verhältnis zu den Molekülen des anderen Körpers hat, kann offenbar die Molekularverbindung beider Körper kaum aus einer bestimmten Anzahl der Moleküle beider Art bestehen. Da die Moleküle der Proteide unvergleichbar größer sein können, als die Moleküle der Lipoide, könnte man ebenfalls nicht verlangen, daß ihre chemischen Verbindungen aus einer bestimmten Anzahl der Moleküle beider Körper zusammengesetzt wären. Die Anzahl der Lipoidmoleküle kann offenbar bei der Sättigung chemischer Kräfte hundertmal so groß sein, als die der Proteidmoleküle; sie kann aber beim Mangel an Lipoiden so klein werden, daß Lipoid durch chemische Analyse würde nicht nachgewiesen werden können.

Es liegt nichts Unwahrscheinliches in der Annahme, daß Eiweißkörper mit Lipoiden im Protoplasma chemisch verbunden sind, weil ähnliche, aber viel beständigere Verbindungen von Eiweißkörpern mit Phosphatiden überall in den Organismen verbreitet sind. Anders kann

---

[1]) Zusatz von Eiweißkörpern zu Lösungen von Lipoiden in Wasser beeinflußt diese Erscheinung nicht.

[2]) Vgl. meine „Kolloidchemie des Protoplasmas" S. 164 ff.

[3]) *H. Staudinger*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1924, Nr. 26, S. 578.

man die Tatsache nicht erklären, daß Äther nur einen Teil der Lipoide aus protoplasmahaltigen Tier- oder Pflanzenobjekten extrahieren kann. Erst nach der Behandlung mit Alkohol und sogar noch einer Hydrolyse mit Säuren läßt sich die ganze Lipoidmenge mit Äther extrahieren[1]).

Wie früher auseinandergesetzt wurde, enthält auch das Plasmodium von Fuligo varians eine sehr beständige Verbindung von Eiweiß mit Phytosterin („Plasmatin"). Eine Reihe von chemischen Verbindungen von Lecithin und Eiweißkörpern wurde von *Liebermann*[2]) aus verschiedenen Organen der Tiere isoliert und von *Mayer* und *Terroine*[3]) auch künstlich erhalten. Weitere Untersuchung der sogenannten Lecithinalbumine wurde von *Galeotti* und *Giampalmo* gemacht[4]). Daß die Verbindungen von Lecithin und Eiweißkörper als Niederschläge in ihren Gemischen (in sauren Lösungen) entstehen, spricht noch nichts darüber, daß sie Adsorptionsverbindungen, aber nicht Molekularverbindungen sind.

Schon *Hoppe-Seyler*[5]) behauptete, daß Ovovitellin und Hämoglobin in roten Blutkörperchen mit Lecithin verbunden sind. Auch Fett im Blute soll zum Teil in einer Form vorhanden sein, in der es durch Äther nicht extrahiert werden kann[6]).

Neuerdings zeigte *Biedermann*[7]), daß das Protoplasma der höheren Pflanzen bei künstlicher Verdauung sich nicht angreifen läßt, wenn es vorher nicht mit Alkohol, Äther und Chloroform extrahiert worden war. Auch *Walter*[8]), der die Verdauung des Plasmodiumprotoplasmas mit Pepsin und Trypsin untersuchte, kam zu dem Schluß, daß das Protoplasma vor der Extraktion mit Alkohol, Äther und Chloroform durch Pepsin und Trypsin nicht angegriffen wird.

Alkohol zerstört die Verbindung von Eiweißkörpern mit Lecithin schon deshalb, weil er Eiweißkörper chemisch verändert[9]).

Bei meinen chemischen Untersuchungen des Plasmodiums habe ich es ohne eine vorherige Extraktion mit Alkohol und Äther einer lange dauernden (3 Wochen) Verdauung durch Pepsin-Salzsäure (1 Proz. Pepsin, 0,4 Proz. HCl)

---

[1]) *Kossel*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**, 3240, 1901; *O. Histand*, Entwicklung unserer Kenntnisse über die Phosphatide. Zürich 1906; *Bang*, Chemie der Lipoide 1910.

[2]) *Liebermann*, Pflügers Arch. **50**, 25, 1890; **54**, 585, 1893.

[3]) *Mayer* und *Terroine*, C. r. Acad. de Sc. **143**, 515, 1906; C. r. d. Biol. **61**, 353, 397, 431 und 531, 1906; **62**, 42, 1907.

[4]) *Galeotti* und *Giampalmo*, Kolloid-Zeitschr. **3**, 118, 1908; Arch. di fisiol. **6**, 503, 1908.

[5]) Zitiert nach *Bottazzi*, Handb. d. vgl. Physiol., S. 88.

[6]) *Cohnstein* und *Michaelis*, Pflügers Arch. **65**, 473, 1896; **69**, 76, 1897; *Mansfeld*, ebendaselbst **129**, 46, 63, 1909.

[7]) *Biedermann*, Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. VIII. Ebendaselbst **174**.

[8]) *H. Walter*, diese Zeitschr. **122**, 86, 1921.

[9]) Vgl. meinen Aufsatz in Kolloid-Zeitschr. **22**, 100, 1923.

im frischen Zustande bei 28° C unterworfen, wobei von 7,1960 g Plasmodium, das 88,2 Proz. Wasser enthielt, 0,0799 g unverdauten Rests zurückblieb (getrocknet im Vakuumexsikkator), d. h. 9,4 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums. Dieser Rest bestand aus 0,0442 g Lipoiden und 0,0357 g „Plasmatin", d. h. Lipoproteiden. Bei einer lange dauernden Einwirkung von Pepsin-Salzsäure werden also die meisten Verbindungen von Proteiden und Lipoiden zerlegt, während der Rest (Plasmatin) sich nur durch starke Säuren zerlegen läßt.

Da der größte Teil der Lipoide des toten Plasmodiums direkt durch Äther extrahierbar ist, schloß ich in meinem oben zitierten Aufsatz, daß die meisten Lipoide des toten Plasmodiums frei sind. Nur ein Teil dieser Substanzen außer derjenigen, welche das Plasmatin bilden, schien mir mit Eiweißkörpern verbunden zu sein, weil nach der Hydrolyse mit 5proz. H_2SO_4 während 48 Stunden aus dem Reste nur noch 1,9 Proz. des Trockengewichts des Plasmodiums Lipoide extrahiert werden konnten (l. c., S. 186). Die Angaben von *Biedermann* und *Walter* beziehen sich leider nur auf eine sichtbare Veränderung des Protoplasmas unter der Einwirkung von Enzymen. Eine quantitative Schätzung der Enzymwirkung fehlt in beiden Arbeiten. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß in meinen Versuchen ein Teil der Verbindungen von Lipoiden und Eiweißkörpern schon durch Einwirkung von Äther zerlegt wurde, weil Äther, wenn auch bei weitem nicht so stark, wie Alkohol, aber doch auf Eiweißkörper denaturierend wirkt.

Wir müssen uns also die Sache so vorstellen, daß der größte Teil der Verbindungen von Eiweißkörpern und Lipoiden, welche die Grundmasse des Protoplasmas gemeinsam mit Wasser bilden, schon beim Absterben sich zersetzen und das ganze physikalische System des Protoplasmas zerstören. Ein Teil dieser Verbindungen wird aber möglicherweise erst durch Einwirkung von Äther, Alkohol und Säuren zerlegt.

Wir möchten uns noch eine Weile mit der chemischen Zusammensetzung des lebenden Zellkerns und der lebenden pflanzlichen Chromatophoren beschäftigen. Die beiden genannten Arten der lebenden Materie färben sich bei der Vitalfärbung gewöhnlich nicht. Nach *Fischel*[1]) sollen sich die Kerne überhaupt nur im geschädigten Zustande bei der Vitalfällung färben. Nach meinen Untersuchungen können sich in den Kernen und pflanzlichen Chromatophoren nur einzelne Körnchen bei der Vitalfärbung färben, vorausgesetzt, daß die Kerne vollkommen lebend sind. Die Kerne sind empfindlicher als das Protoplasma, und deshalb kann es vorkommen, daß z. B. Vortizellen ihre Bewegungen in Methylenblaulösungen noch fortsetzen, während der Kern schon gefärbt ist. Ähnlich verhalten sich nach meinen Untersuchungen lebende Chloroplasten. Erst nach dem Absterben lassen sie sich bei der Vitalfärbung färben.

---

[1]) *A. Fischel*, Anatom. Hefte **11**, 1899; **16**, 1901. Artikel in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik **1**, 1903.

Wir können also schließen, daß auch in den lebenden Kernen und pflanzlichen Chromatophoren Eiweißkörper und Lipoide chemisch verbunden sind. Ähnlich wie im Protoplasma sind die Verbindungen der genannten Substanzen sehr unbeständig. Alle Reagenzien, die Eiweißkörper oder Lipoide in irgend einer Weise chemisch verändern, rufen auch diesmal den Zerfall dieser Verbindungen und das Absterben hervor. Auch mechanische Einwirkungen rufen diesen Zerfall hervor, und sowohl die Kerne als auch pflanzliche Chromatophoren erlangen die Fähigkeit, gefärbt zu werden.

Über die Ausscheidung von intravenös eingeführtem Calcium.

Von

J. Dadlez.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów.)

(Eingegangen am 18. Februar 1926.)

Calciumsalze sind in der Therapie schon sehr lange im Gebrauch, und seitdem dieses Mittel zum ersten Male versucht wurde, verbreitete sich seine Anwendung bei verschiedenen Krankheiten als Prophylacticum oder Therapeuticum ungemein, und zwar in mannigfacher Gestalt; innerlich verabreicht als Chlorid, Carbonat, Lactat, Bromid, Phosphat, äußerlich in Verbindung mit anderen Präparaten, schließlich auch als Calciumchlorid in Form von intravenösen Injektionen. Tatsächlich ist es gelungen, an einer ganzen Reihe pathologischer Zustände die günstige Wirkung des Calciums zu beobachten, sogar in Fällen von Lungentuberkulose, wo große Dosen von Calciumchlorid serienweise injiziert wurden, bis vor kurzem von der Vorstellung getragen, daß man auf diese Weise den Prozeß der Calcifizierung der Krankheitsherde werde beschleunigen können, um so mehr, als die selbständige Ausheilung der Tuberkulose öfters von einer Verkalkung der Krankheitsherde begleitet wird. Es ist also nicht verwunderlich, daß die Wirkungsweise von Calcium zahlreichen Untersuchungen unterworfen wurde. In letzter Zeit beschäftigte man sich mit der Frage der Zurückhaltung künstlich eingeführter Kalksalze, und zwar, ob eine reichliche Kalkzufuhr eine Zurückhaltung desselben im Organismus hervorrufen kann und ob das außerhalb der Nahrung in großen Mengen eingeführte Calcium — innerlich als Lactat oder intravenös als Chlorid — ausgeschieden wird oder nicht, eventuell wie lange? Man bemühte sich, die behandelte Frage auf verschiedene Art zu lösen, indem man bei Menschen und Tieren Calcium innerlich verabreichte oder subkutan und intravenös injizierte. Da nun die intravenöse Einführung sicherlich in kürzester Zeit eine Kalksättigung des Organismus hervorruft, weil doch das Calcium in diesem Falle unmittelbar in den Blutkreislauf gelangt, so werde ich mich bemühen, hauptsächlich die Frage nach

dem Schicksal der intravenösen Injektionen von $CaCl_2$ zu behandeln, um so mehr, als eben diese Art heute in der Therapie weit verbreitet ist.

Was geschieht mit dem in das Venenblut gebrachten Calcium, wohin gelangt es? Wird es vollkommen im Harn und Kote ausgeschieden oder wird es teilweise in den Organen, eventuell in den Knochen, abgelagert.

Eine Reihe von Autoren gelangte durch Blutanalysen bei den Tieren (*Heubner* und *Rona*, *Clark*, *Fenyvesse* und *Freund*) und Menschen (*Billigheimer*, *Sieburg* und *Kessler*, *Trillet*, *Hetényi*) zu dem Beweis, daß der Blutkalkspiegel in ungefähr 2 bis 3 Stunden nach intravenöser Injektion von Kalksalzen zur Norm zurückkehrt. Andererseits wurden schon früher Organanalysen angestellt (*Kost*), sowie in neuerer Zeit von *Heubner* und *Rona*, *Hecht*, *Jungmann* und *Samter*. *Heubner* und *Rona* gelangten nach Untersuchungen, die eine besondere Beachtung verdienen, zu der Überzeugung, daß der normale Kalkgehalt innerhalb weiter Grenzen variiert, und konnten trotz intravenöser Einführung großer Calciumdosen irgendwelche Änderungen in den Organen nicht bemerken, mit Ausnahme der Niere, wo es möglich ist, bei akuter Vergiftung einen Überschuß an Calcium festzustellen. In späteren Arbeiten zeigte *Heubner* bei akuter Vergiftung eine Zunahme des Kalkgehalts im Klein- und Mittelhirn, wobei er der analogen Resultate gedachte, zu denen *Jungmann* und *Samter* gelangten. Es muß bemerkt werden, daß die Organe in 3 bis 6 Stunden nach der Injektion untersucht wurden, und daß diese Erscheinung bei großen, toxischen Dosen beobachtet wurde. Da nun der Kalk in Niere und Hirn bei akuter Vergiftung nur in kleinen Mengen abgelagert wird, während andere Organe ein Abweichen von der Norm nicht zeigen, so dachten *Heubner* und *Rona* an die Möglichkeit der Zurückhaltung des Calciums in den Knochen, mit dem Vorbehalte einer eventuellen Kotanalyse, um die Ausscheidung auf diesem Wege auszuschließen. Da die bisherigen Arbeiten kein zweifelloses Bild über das Schicksal des intravenös eingeführten Kalkes lieferten, versuchte *Hetényi*, indem er zwei Kaninchen Calciumchlorid in das Blut einführte, die in Rede stehende Frage zu lösen; nach 3 Stunden tötete er eines der Tiere, entnahm aus der Blase den Harn, aus dem Rectum den Kot, und prüfte beide. Durch Vergleiche mit dem Kontrollkaninchen gelangte er zu dem Schluß, daß im Mittel 15,6 Proz. Calcium im Verhältnis zur ursprünglichen Dosis ausgeschieden wurden. Derselbe Autor nahm intravenöse Kalkinjektionen an 20 Personen vor und zeigte, auf Blut- und Harnanalysen gestützt, daß der Kalkgehalt des Blutes nach 3 Stunden normal ist, und daß in derselben Zeit von 260 mg injizierten Calciums durch die Nieren 35 mg ausgeschieden wurden. Durch Vergleich mit dem Tierversuch glaubt er eine Ausscheidung im Kote auf höchstens 90 mg anschlagen zu dürfen; im ganzen blieben also von der injizierten Dosis 50 Proz. oder 130 mg im Organismus zurück. Nach Verlauf von 3 Stunden wird demnach ein Zustand erreicht, in dem der Blutkalk normal ist, die Weichteile nicht kalkreicher sind als sonst (bei Dosen, die eine Vergiftung noch nicht hervorgerufen), während im Harn und Kote bloß 50 Proz. zur Ausscheidung gelangten. Um sich davon zu überzeugen, was mit dem restlichen Calcium geschieht, amputiert *Hetényi* zwei Kaninchen vor der Injektion die linke hintere Extremität, nach der intravenösen Injektion einer tödlichen Dosis die rechte hintere Extremität, prüft den Kalkgehalt in den Knochen und gelangt, nachdem es ihm gelungen war,

auf diese Weise einen kleinen Kalküberschuß in der amputierten Extremität nach der Injektion festzustellen zu der Folgerung, daß die Knochen eine bedeutende Rolle in der Calciumzurückhaltung im Organismus spielen.

Es erhebt sich aber die Frage, ob die Zurückhaltung des Calciums eine beständige ist oder nur eine temporäre, weil die Möglichkeit vorhanden ist, daß in weiteren Stunden der zurückgehaltene Rest im Harn und Kote ausgeschieden wird. Deshalb bemühte ich mich, eine Calciumbilanz nach Calciumchloridinjektionen bei Kaninchen und Menschen aufzustellen. Zu diesem Zwecke wählte ich einen tuberkulösen Kranken, erstens weil bei solchen Kranken ohnehin Calcium appliziert wird, und zweitens, um sich zu überzeugen, ob bei der Tuberkulose von einer Ablagerung des künstlich eingeführten Calciums die Rede sein kann und ob wir in ihr die Ursache einer mehrmals beobachteten Besserung erblicken dürfen.

Es soll noch erwähnt werden, daß analog den von *Heubner* und *Rona* in großem Maßstab durchgeführten Arbeiten bei Katzen, auch von *Mary Maver* und *Gideon Wells* Organe von Meerschweinchen und Mäusen analysiert wurden mit dem Ergebnis, daß auf dem Wege einer Kalkzufuhr eine Vergrößerung des Kalkgehalts in den Organen nicht zu erreichen ist, mit Ausnahme vielleicht der Niere als ausscheidendem Organ. Die Anhäufung des Calciums im tuberkulösen Gewebe des Scrotum von Mereschweinchen ist dagegen unabhängig von der Calciumdarreichung; daher gelangen die Autoren zu dem Schluß, daß das bei Tuberkulose eingeführte Calcium in den Geweben nicht aufgenommen wird.

Den Calciumstoffwechsel bestimmte ich beim Kaninchen auf die Weise, daß das Tier zuerst 7 Tage bei derselben Diät blieb, nach 7 Tagen sammelte ich seinen Harn und Kot, während gleichzeitig eine Analyse der gebotenen Nahrung angestellt wurde; nach weiteren 6 Tagen injizierte ich Calcium intravenös. Zur Aufstellung der Calciumbilanz beim Menschen wählte ich einen intelligenten tuberkulösen Kranken, welcher gern in die Durchführung des Versuchs einwilligte und, wie ich mich mehrmals überzeugen konnte, die Menge der täglichen Nahrung genau abmaß und abwog, die Exkremente dagegen in den überlassenen Gefäßen peinlich sammelte.

Methodik.

A. Kotanalysen wurden auf die Weise ausgeführt, daß der während 3 Tagen gesammelte Kot mit Alkohol verrieben wurde, auf einem Wasserbad bis zur Trockne abgedampft, genau gepulvert und abgewogen wurde. Von den abgewogenen Mengen wurden 2 g im Platintiegel verbrannt und die Asche in Salzsäure gelöst. Nach Befreiung der Lösung von Phosphaten mit Eisenchlorid wurde das Calcium bei schwach saurer Reaktion durch Ammoniumoxalat gefällt. Nachher wurde der Niederschlag durch ein

gehärtetes Filter filtriert und der Calciumgehalt entweder durch Abwägen oder öfters durch hypermangansaures Kalium bestimmt, wobei das Filter mehrere Male mit Wasser bespült wurde, um eine vollkommene Entfernung der Oxalsäurereste zu erreichen. Ähnlich bin ich mit der Bestimmung des Calciums in der Nahrung verfahren, indem ich in einem Platintiegel 2 g frischer Substanz verbrannte, Phosphate, wenn sie in größerer Zahl auftraten, mittels Eisen entfernte, während dort, wo geringere Mengen vermutet wurden, das Calcium unmittelbar in gelöster Asche in Anwesenheit von Essigsäure gefällt wurde, nach vorheriger Neutralisation der Salzsäure mit Ammoniak.

B. Die tägliche Harnmenge wurde bis zu einem bestimmten Volumen verdünnt, 100 ccm durch Ammoniak stark alkalisiert und nach 24 Stunden der Niederschlag auf einem Filter nach vorheriger Auswaschung mit Ammoniak in Salzsäure im Warmen gelöst. In der so erhaltenen Flüssigkeit wurde das Calcium bestimmt, im Menschenharn unmittelbar, im Kaninchenharn dagegen nachdem erst die Phosphate durch Eisen entfernt worden waren. Manchmal habe ich denselben Harn mit und ohne Phosphate geprüft, um sicher zu sein, daß die längere Prozedur, welche durch die Anwendung von Eisenchlorid verursacht wird, auf das Ergebnis der Analyse ohne Einfluß bleibt. Es wurden wenigstens zwei Kontrollanalysen des Kotes und des Harns angestellt.

C. Das Blut prüfte ich nach der von *de Waard* angegebenen Methode mit dem Unterschied, daß ich mich der Zentrifuge meistens nicht bediente, sondern den Niederschlag auf einem gehärteten Filter von 4 cm Durchmesser sammelte und nach peinlicher Abspülung mit n/100 $KMnO_4$ titrierte, wobei ich von dem Ratschlag des Autors Gebrauch machte, welcher empfiehlt, von dem Kontrollwasser eine solche Menge übermangansaures Kalium abzuziehen, wie notwendig ist, um eine Färbung hervorzurufen.

D. Das zu intravenösen Injektionen verwendete Calciumchlorid war aus 15proz. $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$-Lösung angefertigt; die Analyse ergab in 1 ccm dieser Lösung 0,03 g Calcium.

I.

Die zum Versuch verwendete Nahrung wurde auf Calcium analysiert. Das in den Tabellen ersichtliche Ergebnis der Analysen gestattet zu ersehen, wieviel Gramm Calcium die aufgenommene

Tabelle I.

Nahrung	Die Ca-Menge in 100 g frischer Substanz bzw. in 100 ccm Flüssigkeit g	Nahrung	Die Ca-Menge in 100 g frischer Substanz bzw. in 100 ccm Flüssigkeit g
Rindfleisch	0,010	Butter	0,017
Schweinefleisch . . .	0,038	Wasser	0,0065
Kalbfleisch	0,0096	Milch	0,130
Roggenbrot	0,027	Bier, Porter (Lwów)	0,0074
Weizenmehl	0,031	Saure Gurke	0,041
Kartoffeln	0,005	Weichsel-Konfitüre .	0,013
Eier	0,060	Hafer	0,230
1 Ei (Gewicht 43 g) .	0,026	Rote Rüben	0,039

Nahrung auf 100 g frischer Substanz oder 100 ccm Wasser, Bier, Milch enthält; die Zahlen stellen ein Mittel von zwei bis vier Analysen dar.

Was die Calciummenge in hier nicht angeführter Nahrung betrifft, so bediente ich mich der im Werke *Königs* angeführten Analysen.

II.

Ein Kaninchen, männlich, Gewicht 2600 g, das in einem Stoffwechselkäfig gehalten wurde, erhielt als Nahrung Hafer und rote Rüben; nach einigen Tagen wurde der Harn und der Kot gesammelt und gleichzeitig die Menge der verzehrten Nahrung gemessen. Am vierten Tage erhielt das Tier eine intravenöse Injektion von 5 ccm 15proz. $CaCl_2$ = 0,15 g Ca, am achten Tage 4 ccm 15proz. $CaCl_2$ = 0,12 g Ca.

Tabelle II.
Kaninchen ♂ Gewicht 2,6 kg.

Tag	Die Ca-Menge in der Nahrung g	Die intravenös injizierte Ca-Menge	Die Totalmenge des eingeführten Ca g	Die Ca-Menge im Harn g	Die Ca-Menge im Kote g	Die Totalmenge des ausgeschiedenen Ca g	Bilanz g
20. IV.	0,242						
21. IV.	0,285		0,781	0,172	0,376	0,767	+ 0,014
22. IV.	0,254			0,219			
23. IV.	0,139	5 ccm 15 proz. $CaCl_2$ = 0,15 g Ca		0,382	0,280		
24. IV.	0,193		0,952			0,972	— 0,020
25. IV.	0,208			0,100	0,210		
26. IV.	0,262						
27. IV.	0,278	4 ccm 15 proz. $CaCl_2$ = 0,12 g Ca					
28. IV.	0,294		0,973	0,360	0,632	0,992	— 0,019
29. IV.	0,281						
Summe			2,706			2,731	— 0,025

In Summa wurden 0,27 g Calcium injiziert; zusammen mit der Nahrung wurden 2,706 g Calcium eingeführt. Wenn nun 50 Proz. des intravenös eingebrachten Calciums im Organismus verbleiben würden, so müßte die Menge des ausgeschiedenen Calciums ungefähr 2,601 g betragen; wenn nur 30 Proz. irgendwo zur Ablagerung gelangen würden, dann könnte man dies auch bemerken, denn die ausgeschiedene Calciummenge stünde in diesem Falle um 2,650 g herum, was in der Totalbilanz z. B. durch die Zahlen + 60 mg, + 70 mg angedeutet wäre. Analog würde sich die Sache mit den Tagesbilanzen verhalten. Wir sehen aber, daß die Bilanzen in folgenden Grenzen variieren: + 14 mg, — 20 mg, — 19 mg, was in Summa — 25 mg ergibt. In diesem Falle kam also die ganze Menge des injizierten Calciums zur Ausscheidung.

III.

Bei einem Kranken, an welchem der Versuch angestellt wurde, wurde eine Lungenspitzenaffektion festgestellt (verschärftes alveolares Atmen und einige Rasselgeräusche), im Sputum *Koch*sche Bazillen. Der Kranke wußte, daß es sich um eine genaue Zusammenstellung des aufgenommenen und ausgeschiedenen Calciums handelt, und erklärte selbst, daß ihm das Sammeln des Kotes keine Schwierigkeiten bereiten werde, da er bloß einmal am Morgen Stuhl hätte. Anfänglich nahm er es mit der Aufzeichnung der verzehrten Nahrung nicht so genau, nach einigen Tagen gewöhnte er sich aber daran, seine Aufmerksamkeit sogar auf die geringste Menge Nahrung, was Quantum und Qualität betrifft, zu lenken. Nach einer Woche konnte ich mit dem Versuch beginnen und stelle nun das Ergebnis in beigefügter Tabelle zusammen. Am 7. Tage wurden intravenös 8,5 ccm 15proz. $CaCl_2$ = 0,255 g Calcium, am 10. Tage 10 ccm 15proz. $CaCl_2$ = 0,3 g Calcium injiziert.

Tabelle III.

Tag	Die Ca-Menge in der Nahrung g	Die intravenös injizierte Ca-Menge	Die Totalmenge des eingeführten Ca g	Die Ca-Menge im Harn g	Die Ca-Menge im Kote g	Die Totalmenge des ausgeschiedenen Ca g	Bilanz g
11. XI.	1,324						
12. XI.	1,345		3,800	0,477	3,028	3,505	+ 0,295
13. XI.	1,131						
14. XI.	2,196			0,147			
15. XI.			3,983	0,138	3,800	4,269	— 0,286
16. XI.	1,787			0,184			
17. XI.	1,525	8,5 ccm 15proz. $CaCl_2$ = 0,255 g Ca		0,263			
18. XI.	1,483		4,634	0,327	4,040	4,630	+ 0,004
19. XI.	1,371						
20. XI.	0,928	10 ccm 15proz. $CaCl_2$ = 0,3 g Ca		0,255			
21. XI.	1,067		2,846	0,390	2,190	2,835	+ 0,011
22. XI.	0,551						
Summe			15,263			15,239	+ 0,024

Vor allem möchte ich die Aufmerksamkeit auf die Bilanz der ersten 6 Tage richten. Die ersten 3 Tage weisen + 295 mg Calcium auf, die folgenden 3 Tage — 286 mg Calcium, in Summa + 9 mg Calcium, was höchstwahrscheinlich auf ein Zurückbleiben der Nahrungsreste aus den ersten 3 Tagen im Kote zurückzuführen ist, welche Reste ihren Einfluß in der negativen Bilanz der letzten 3 Tage ihren Ausdruck finden. In Summa wurden intravenös 0,555 g Calcium eingeführt. Wenn nun 50 Proz. dieser Menge im Organismus zurückbleiben würden,

dann hätten wir eine allgemeine Bilanz von ungefähr + 274 mg Calcium; wenn auch nur 20 Proz. aufgehalten wären, dann könnte man dies feststellen, denn in diesem Falle müßte die Bilanz + 130 mg Calcium aufweisen. Nun bewegt sich aber das Ergebnis in folgenden Grenzen: + 9 mg, + 4 mg, + 11 mg, in Summa + 24 mg. Wenn wir dazu noch den Harn berücksichtigen und die Zahlen der täglichen Calciumausscheidung zusammenstellen, dann bemerken wir, daß sich am Tage der Injektion immer ein kleiner Überschuß von 0,1 bis 0,08 g Calcium bemerkbar macht, was dafür spricht, daß im Harn ein Drittel des intravenös eingeführten Calciums ausgeschieden wurde, während der Rest (zwei Drittel) im Kote zur Ausscheidung gelangte. Dieses Ausscheidungsverhältnis des intravenös eingeführten Calciums auf dem Wege der Nieren und des Darmes gibt auch *Hetényi* an, auf Grund von Experimenten bei Kaninchen und Harnanalysen bei Menschen.

Tabelle IV.

Harn.

Tag	Die Ca-Menge im Harn g	Tag	Die Ca-Menge im Harn g	Tag	Die Ca-Menge im Harn g	Tag	Die Ca-Menge im Harn g
11. XI.	0,159	14. XI.	0,147	17. XI.	0,263	20. XI.	0,255
12. XI.	0,159	15. XI.	0,138	18. XI.	0,163	21. XI.	0,195
13. XI.	0,159	16. XI.	0,184	19. XI.	0,164	22. XI.	0,195

Die Zahlen vom 21. und 22., vom 18. und 19., vom 11., 12. und 13. November stellen ein in diesen Tagen gewonnenes Mittel dar. Auch füge ich eine Tabelle bei, welche die Nahrung am 20., 21. und 22. November angibt, als Beispiel für die Ernährungsweise des Kranken, dem in dieser Hinsicht vollkommene Freiheit überlassen wurde (Tab. V).

IV.

Die Versuche ergänzend, wollte ich mich noch überzeugen, ob das Blut bei tuberkulösen Individuen nach einer Reihe von intravenösen Calciuminjektionen einen Calciumüberschuß aufweisen wird, und wie schnell das Blutbild zur Norm zurückkehren wird. Den Calciumgehalt des Blutserums stellte ich vor der Injektion, in verschiedener Zeit nach der Injektion und nach mehreren Injektionen fest.

Der Kranke A:

a) vor der Injektion . . . . 10,2 mg Ca,
b) 20 Minuten nach der Injektion, 10 ccm 15proz. $CaCl_2 . 6 H_2O$ . . . . 14,4 „ Ca,
c) 180 Minuten nach der Injektion (Menge und Lösung wie bei b) . . . . 10,6 „ Ca

auf 100 ccm Blut.

Tabelle V.

Die Nahrung am 20. XI.	Die Nahrungsmenge am 20. XI.	Die Ca-Menge in der Nahrung am 20. XI. g	Die Nahrung am 21. XI.	Die Nahrungsmenge am 21. XI.	Die Ca-Menge in der Nahrung am 21. XI. g	Die Nahrung am 22. XI.	Die Nahrungsmenge am 22. XI.	Die Ca-Menge in der Nahrung am 22. XI. g
Milch	500 ccm	0,650	Milch	700 ccm	0,910	Milch	200 ccm	0,260
Wasser	950 „	0,061	Wasser	500 „	0,032	Wasser	600 „	0,039
Rindfleisch . .	80 g	0,008	Schweinefleisch .	140 g	0,053	Bier, Porter (Lwów) .	500 „	0,037
Eier	172 g	0,104	Kartoffeln . . .	220 g	0,011	Rindfleisch . . .	160 g	0,016
Butter	50 g	0,008	Reis	100 g	0,012	Reis	70 g	0,008
Brot	60 g	0,016	Butter	40 g	0,006	Weizenmehl . . .	140 g	0,043
Kartoffeln . .	150 g	0,007	Brot	60 g	0,016	Zucker	50 g	—
Reis	50 g	0,006	Zucker	10 g	—	Butter	40 g	0,006
Zucker	100 g	—	Eier	43 g	0,026	Schweinefleisch .	80 g	0,030
Weizenmehl . .	220 g	0,068	Honig	30 g	0,001	Eier	43 g	0,026
						Saure Gurke . .	210 g	0,086
Summe	—	0,928	Summe	—	1,067	Summe	—	0,551

Derselbe Kranke erhielt nachher in zweitägigen Zwischenräumen à 10 ccm Calciumchlorid intravenös, worauf die elfte Injektion berücksichtigt wurde:

a) vor der elften Injektion . . . . 8,5 mg Ca,
b) 20 Minuten nach der Injektion . . . . . 11,05 „ Ca,
c) 120 Minuten nach der Injektion. . . . . 8,35 „ Ca

auf 100 ccm Blut.

Der Kranke B bekam vor dem Versuch 15 intravenöse Calciumchloridinjektionen. Die 16. Injektion wurde berücksichtigt:

a) vor der 16. Injektion . . . . 9,2 mg Ca,
b) 20 Minuten nach der Injektion . . . . . 13,7 „ Ca,
c) 120 „ „ „ . . . . . 8,5 „ Ca

auf 100 ccm Blut.

Der Kranke C:

a) vor der Injektion . . . . 6,9 mg Ca,
b) 20 Minuten nach der Injektion. . . . . 10,2 „ Ca,
c) 120 „ „ „ „ . . . . . 7,1 „ Ca

auf 100 ccm Blut.

Es wurden immer à 10 ccm 15proz. $CaCl_2 . 6 H_2O$ injiziert.

Aus obiger Zusammenstellung geht hervor, daß das intravenös injizierte Calcium bei den Tuberkulösen ebenso rasch aus dem Blute schwindet wie bei Gesunden, ohne Rücksicht auf die Anzahl der vorhergehenden Injektionen. Ein ähnlicher Effekt stellt sich nach der ersten und zweiten Injektion ein, und wie aus der oben beigefügten Calciumbilanz des Tuberkulösen ersichtlich, wird das injizierte Calcium vollständig ausgeschieden. Da nun nach der zehnten Injektion das Blutbild ebenso rasch zur Norm zurückkehrt wie nach der ersten, so könnte man annehmen, daß die nach der zehnten Injektion aufgestellte Bilanz zeigen würde, daß das künstlich eingeführte Calcium vollkommen ausgeschieden wird, oder daß es nicht möglich ist, trotz einer langen Reihe von Injektionen eine Calciumablagerung im tuberkulösen Organismus zu erreichen.

V.

Zum Schluß möchte ich noch die Aufmerksamkeit auf den Versuch *Hetényis* lenken, welcher zeigt, daß das Calcium bloß in einer Menge von 50 Proz. binnen 3 Stunden nach intravenöser Darreichung ausgeschieden wird. Von der Richtigkeit dieser Anschauung überzeugte ich mich durch Harnanalysen bei einigen Kranken; das Calcium schwindet aus dem Blute, wird im Organismus, vielleicht in den Knochen und im Kleinhirn deponiert, jedoch nur zeitweilig, weil noch nach 6 Stunden eine übernormale Menge Calcium im Harn nachweisbar ist.

Das alles spricht für ein fortwährendes Schwinden der Calciumreste aus dem Organismus auf dem Wege der Nieren und des Darmes, bis eine vollkommene, nach 24 Stunden feststellbare Ausscheidung des intravenös eingeführten Calciums erreicht ist.

Literatur.

1) *Heubner* und *Rona*, diese Zeitschr. **135**, 248, 1923. — 2) *Hecht*, ebendaselbst **144**, 270, 1924. — 3) *Jungmann* und *Samter*, ebendaselbst **144**, 265, 1924. — 4) *Hetényi*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **48**, 131, 1924. — 5) *Mary Maver* and *Gideon Wells*, Amer. rev. of tubercul. **7**, Nr. 1, S. 1, 1923, zitiert nach Ber. f. d. ges. Physiol. u. exp. Pharm. **21**, 309. — 6) *de Waard*, diese Zeitschr. **97**, 176, 1919. — 7) *J. König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- u. Genußmittel (4. Aufl., Berlin, Julius Springer).

Studium der Eiweißkörperkoagulation in Tropfen.

VIII. Mitteilung:

Unterschiede in der Koagulation des reinen und Hb-Serums des Pferdes, Rindes, Schweines und Hundes.

Von

St. Reiner, F. Pluhař und **B. Hánys̆.**

(Aus dem chemischen Institut der tierärztlichen Hochschule in Brno, Tschechoslowakei.)

(Eingegangen am 18. Februar 1926.)

Aus den Resultaten der bisher veröffentlichten Arbeiten auf dem Gebiet der Eiweißkoagulation mittels der *Bečka*schen Tropfenmethode sind gewisse Regelmäßigkeiten ersichtlich. In vorliegender Arbeit wurde das reine und das Hämoglobin-Blutserum (Hb-Serum) von Pferd, Rind, Schwein und Hund untersucht. Um die Resultate möglichst gleichartig (eindeutig) zusammenzustellen und den Vergleich der Versuchsergebnisse zu ermöglichen, wurden im Gegensatz zu den früheren Arbeiten (Untersuchung des Normalserums mit vollem Eiweißkörpergehalt) die einzelnen Seren immer auf 1 Proz. Eiweiß verdünnt; die Fällungsmittel hatten eine Konzentration von m/10.

Die Aufgaben dieser Arbeit sind also:

Untersuchung der Seren von einzelnen Tiergattungen bei derselben Eiweißkonzentration, wodurch die Eiweißunterschiede zum Ausdruck kommen sollen.

Die Sicherstellung der Fällungsunterschiede von reinem und Hämoglobinserum (Hb-Serum); bei letzterem konnte der Einfluß des Hämoglobins mit seinen Derivaten, welche beim Verdünnen des Blutes durch destilliertes Wasser in die Lösung kommen, studiert werden.

Zuletzt wurden auch noch einige bisher nicht benutzte Fällungsmittel ausprobiert, um ihre spezifischen Fällungseigenschaften zu konstatieren.

Experimenteller Teil.

Die Prozente der gesamten Eiweißkörper wurden durch die Formolzahl (*Steineggers* Methode) bestimmt; es ergaben sich beim Serum übereinstimmende Resultate mit der refraktometrischen Methode.

Als Fällungsmittel wurden m/10 Lösungen folgender 23 Chemikalien benutzt: $CuSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, $FeSO_4$, $KAl(SO_4)_2$, $KCr(SO_4)_2$, $HgCl_2$, $FeCl_3$, $Cd(NO_3)_2$, HNO_3, $H_7P(W_2O_7)_2$, C_6H_5OH, $C_6H_4(OH)_2$, $C_6H_3(OH)_3$, Tannin m/2,9, $HOC_6H_2(NO_2)_3$, $C_6H_3SO_3HOH.COOH$, CH_2ClCO_2H, CCl_3CO_2H, $CH_3CH.OH.COOH$, CH_3COH, $CCl_3CH(OH)_2$, C_2H_5OH und das bei dieser Methode noch nicht angewandte $AgNO_3$.

Als Verdünnungsmittel wurde immer destilliertes Wasser gebraucht.

Um die Resultate leichter vergleichen zu können, nahmen wir als Grundkoagulationszahl die Ergebnisse beim Fällen des 1proz. Serums durch Fällungsmittel in der m/10 Lösung. *Reiner* studierte die Unterschiede zwischen dem reinen und Hämoglobinserum beim Pferde, *Pluhař* beim Schweine- und Hunde- und *Hányš* beim Rinderserum. In den folgenden Kapiteln und Tabellen geben wir die Resultate unserer Versuche wieder.

Von den anorganischen Fällungsmitteln bewirkt $HgCl_2$ sowohl bei reinem als auch bei Hämoglobinserum konstant eine proportionale Erhöhung der Fällungskraft mit dem steigenden Alter der Tiere; eine Ausnahme bildet das Hundeserum. Die Fällungsbilder weisen einen konstanten Typus auf. Bei Seren von alten Pferden bemerkte man eine schwache Variabilität. Die niedrigste Koagulationszahl fand man beim Hundehämoglobinserum, während bei den anderen Tierarten die Koagulation des Hämoglobinserums im Verhältnis zum reinen viel größer war.

$Cd(NO_3)_2$ zeigt einen ähnlichen Typus des Fällungsbildes; auffallend ist die Vergrößerung des gefällten Feldes beim Rinde und die typische Form der Fällungsbilder beim Hunde, welche sich von den Fällungsbildern anderer Tierarten sehr markant unterscheiden. Der Einfluß des Alters auf die Koagulationsfähigkeit prägt sich beim Schweineserum bis zum Alter von 3 Jahren ganz gut aus. Beim Hämoglobinserum vom Pferde, Rinde und Schweine steigt die Fällungsfähigkeit, besonders stark beim Schweine, wo die Koagulationszahl 56 beträgt; beim Hunde bemerkt man dagegen eine auffallende Senkung (Koagulationszahl 36).

Ähnliche Bilder, wie $HgCl_2$ und $Cd(NO_3)_2$ zeigt auch $CuSO_4$. Überaus typisch sind die Bilder beim reinen Rinderserum gegenüber dem Schweinehämoglobinserum. Die größte Fällung weist das reine Schweineserum auf, das dieselbe Koagulationszahl besitzt wie $Cd(NO_3)_2$, und bei welchem auch der Alterseinfluß deutlich ausgeprägt wird. Weiter bemerkt man hier auch eine Erniedrigung der Fällungsfähigkeit des Hämoglobinserums des Hundes gegenüber dem von anderen Tierarten.

Sehr deutlich werden die Serumeiweiße durch die Phosphorwolframsäure koaguliert. Die Fällungsbildertypen sind bei allen Tierarten konstant und übereinstimmend; die größten Unterschiede weist das reine und hämolytische Hundeserum auf. Der Alterseinfluß ist bei diesem Fällungsmittel nicht festzustellen.

Alaune fällen erst in schwächeren Konzentrationen als m/10. Die Fällungstypen sind nicht bedeutend verschieden. Aluminiumalaun besitzt eine stärkere Fällungskraft als Chromalaun. Die Koagulationszahlen beim Hämoglobinserum sind gegen die beim reinen sehr erniedrigt, einige Rinderseren sogar fällte Chromalaun überhaupt nicht. Die Intensität der Trübungen bei beiden Fällungsmitteln ist minimal.

Ta

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im rein. Serum	p_H	Proz. Eiweiß im Hbserum		$HgCl_2$	$Cd(NO_3)_2$	Sulfosalicyl-säure	Phosphor-wolframsäure
1	Wallach	8 Monate	Gesund Gut gefüttert	6,1632	5,6	4,828 46	R. S. Hbs.	VII/11 54 VI/12 66	VI/11 59 VI/12 64	IX/8 43 VIII/6 33	VII/10 58 VII/11 64
2	Stute	1 Jahr	Gesund Gut gefüttert	7,6968	5,4	5,794 152	R. S. Hbs.	VI/11 55 VII/12 74	V/9 42 VII/12 70	VII/8 27 IX/8 43	V/10 45 VI/10 52
3	Wallach	1½ Jahre	Gesund Gut gefüttert	6,336	5,4	4,335 422	R. S. Hbs.	VI/11 57 VII/11 66	VII/10 54 VII/12 63	VIII/8 40 IX/7 39	VI/9 44 VII/10 55
4	Wallach	9 „	Gesund Gut gefüttert	7,74	6,0	4,345 614	R. S. Hbs.	VI/12 67 VII/12 80	VII/12 65 VII/12 73	VII/11 44 VIII/11 47	VI/10 51 VIII/12 80
5	Wallach	14 „	Gesund Schl. gefüttert	8,064	6,4	7,725 536	R. S. Hbs.	VII/10 63 VIII/12 84	VI/9 47 VIII/12 80	VIII/8 39 IX/8 46	VII/9 51 VII/10 58
6	Wallach	15 „	Gesund Mittel gefütt.	8,28	5,4	5,311 306	R. S. Hbs.	VIII/12 83 VII/12 56	VI/11 55 VII/12 69	VIII/10 43 VIII/12 49	VI/9 74 VIII/11 70
7	Stute	etwa 20 Jahre	Gesund Schl. gefüttert	8,494	5,4	8,691 228	R. S. Hbs.	IX/10 86 IX/12 90	VII/10 62 VIII/12 80	IX/5 30 VIII/7 33	IX/10 79 VIII/9 71
8	Stute	etwa 20 Jahre	Gesund Sehr schl. gef.	8,815	6,2	6,276 99	R. S. Hbs.	VI/10 55 VIII/12 77	VI/11 52 VII/12 73	VII/10 33 VIII/9 36	VII/10 62 VIII/10 70
9	Wallach	etwa 20 Jahre	Gesund Schl. gefüttert	8,172	5.6	6,276 99	R. S. Hbs.	VII/12 71 VII/12 71	VII/12 68 VI/12 56	VII/10 42 VIII/7 32	VII/11 63 VII/11 59
10	Stute	20 Jahre	Gesund Mittel gefütt.	8,494	6,2	5,542 72	R. S. Hbs.	IX/11 75 VII/12 72	VII/11 64 VIII/12 80	VII/4 17 VIII/6 35	VII/9 61 IX/10 78

Tabel

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im rein. Serum	p_H	Proz. Eiweiß im Hbserum		$HgCl_2$	$Cd(NO_3)_2$	Sulfosalicyl-säure	Phosphor-wolframsäure
1	Kalbin	1 Jahr	Gesund Schl. gefüttert	7,934	6,4	6,759 84	R. S. Hbs.	VIII/12 83 IX/12 70	VII/12 65 V/12 49	VII/10 31 VII/7 28	VII/11 60 VII/9 49
2	Kalbin	1 „	Gesund Mittel gefütt.	7,5456	6,1	8,208 38	R. S. Hbs.	VII/11 65 VII/12 71	VI/11 60 VIII/12 80	VI/10 43 VIII/7 33	VII/9 49 IX/10 69
3	Kalbin	1 „	Gesund Gut gefüttert	6,876	5,4	7,800 432	R. S. Hbs.	VII/11 65 VIII/12 79	VI/10 47 VI/12 64	VIII/10 53 VIII/12 54	VII/9 51 VIII/12 75
4	Kalbin	1½ Jahre	Gesund Schl. gefüttert	6,336	6,0	8,691 22	R. S. Hbs.	VII/10 58 VIII/12 66	VI/10 55 VI/9 45	X/7 49 IX/8 37	VI/8 40 IX/10 74
5	Kalbin	2 „	Gesund Gut gefüttert	8,494	5,6	5,958 65	R. S. Hbs.	VII/11 66 VIII/12 83	VI/11 54 VII/12 69	VIII/10 49 VII/12 51	IX/10 67 IX/12 87
6	Kuh	2½ „	Gesund Sehr gut gef.	8,454	5,6	5,3112	R. S. Hbs.	VI/9 48 VIII/12 72	V/10 46 VI/12 64	VII/8 32 XI/11 96	VI/9 49 IX/10 75
7	Ochse	3 „	Gesund Schl. gefüttert	7,848	5,4	6,276 99	R. S. Hbs.	VI/11 58 XII/12 94	V/9 40 VIII/10 64	VIII/6 29 VIII/7 36	VII/7 40 VII/8 46
8	Kuh	6 „	Gesund Schl. gefüttert	7,632	6,2	4,091	R. S. Hbs.	VII/12 72 VIII/12 65	VII/12 63 VI/11 46	VIII/10 36 X/8 55	IX/12 66 XI/12 110
9	Kuh	7 „	Gesund Gut gefüttert	8,708	5,4	5,3093	R. S. Hbs.	VII/11 61 V/12 45	V/12 49 V/9 44	VII/6 23 VIII/6 33	VII/7 43 VII/7 41
10	Ochse	7 „	Gesund Sehr gut gef.	7,4808	5,4	6,275 98	R. S. Hbs.	VIII/10 60 VII/12 71	V/11 50 V/9 37	VI/8 25 VII/6 27	IX/10 66 VIII/9 61

[illegible]m.

Pikrinsäure	$KCr(SO_4)_2$	$KAl(SO_4)_2$	$Fe_2(SO_4)_3$	$FeSO_4$	$FeCl_2$	Chloressigsäure	Trichloressigsäure	Acetaldehyd	Milchsäure	Pyrogallol
VII/6 34	IV/10 24	VII/11 56	V/11 31	VI/9 42	V/10 23	V/10 22	IV/8 19	IV/3 11	IV/11 16	VIII/3 12
VI/7 38	III/9 10	IV/10 32	V/11 25	VI/9 24	V/10 20	III/10 11	III/10 10	III/2 6	IV/10 11	VII/2 13
VII/7 39	IV/9 19	VI/11 38	V/11 20	V/7 26	IV/10 19	III/8 16	IV/9 18	IV/3 12	IV/10 21	VI/3 13
VII/6 36	III/9 14	IV/10 24	V/10 20	VI/8 27	IV/10 13	IV/10 14	III/10 18	III/2 6	IV/10 12	VIII/3 16
VII/7 37	IV/10 18	V/9 33	V/10 25	V/8 29	IV/10 13	III/8 8	III/8 15	III/3 8	III/9 8	VII/3 14
VII/8 41	II/8 11	IV/10 25	III/9 10	IV/7 20	IV/10 11	II/7 6	V/7 14	—	III/9 7	VII/3 14
VII/8 39	III/9 12	VI/11 39	IV/11 22	V/10 38	IV/11 17	IV/10 18	IV/9 16	III/4 10	IV/10 11	VIII/3 19
VII/8 43	III/10 9	VI/12 37	V/12 29	VI/12 46	V/12 21	V/11 19	V/11 20	III/5 14	III/10 11	VIII/5 33
VII/7 36	IV/9 17	V/10 43	IV/10 20	VI/4 13	IV/8 19	III/8 7	III/9 13	III/2 5	III/10 11	V/3 8
VII/6 39	III/9 19	V/9 31	III/10 23	V/3 12	IV/9 14	III/10 13	III/10 23	I/1 1	III/10 8	VII/4 20
VII/7 35	V/10 25	VI/11 33	IV/10 21	VII/11 43	V/10 2	IV/10 15	IV/10 19	—	IV/10 14	VII/4 22
VIII/8 47	V/11 14	VI/11 29	V/11 19	VI/11 24	VI/11 22	V/10 17	V/11 17	—	IV/11 11	VIII/4 27
VIII/8 57	III/10 15	V/10 38	IV/11 32	VI/4 19	III/9 13	II/8 6	II/9 11	IV/3 10	III/10 10	VI/4 13
VIII/7 50	II/8 13	V/10 28	III/10 16	V/2 8	V/10 19	III/8 11	III/7 15	—	II/10 11	VIII/5 22
VII/8 39	III/8 15	V/11 36	VI/11 31	V/8 29	V/11 19	III/9 10	IV/9 15	II/4 7	IV/11 11	VIII/4 24
VII/7 38	III/9 14	V/10 31	V/10 22	VI/9 29	IV/11 13	III/7 9	III/9 23	III/5 11	V/10 13	IX/4 30
[illegible]/7 37	V/11 22	VI/11 39	IV/10 19	VI/10 36	V/11 26	IV/10 15	IV/10 16	—	III/11 11	VII/4 23
[illegible]/7 41	IV/11 16	VI/12 34	V/11 19	VI/11 28	V/10 16	V/10 11	V/11 16	—	II/9 5	VIII/5 34
[illegible]/8 38	IV/12 22	VI/11 44	IV/12 41	V/8 27	VI/12 25	IV/9 11	V/10 28	IV/4 13	IV/10 12	V/5 10
[illegible]X/7 41	IV/8 13	V/11 31	IV/9 15	IV/2 6	II/7 5	—	III/2 5	—	—	VII/3 15

[illegible]m.

Pikrinsäure	$KCr(SO_4)_2$	$KAl(SO_4)_2$	$Fe_2(SO_4)_3$	$FeSO_4$	$FeCl_3$	Chloressigsäure	Trichloressigsäure	Acetaldehyd	Milchsäure	Pyrogallol
[illegible] 34	VII/11 27	VII/11 43	V/12 31	IV/6 16	V/11 20	V/9 21	IV/8 15	IV/3 10	IV/10 14	—
[illegible] 40	IV/8 15	IV/10 27	II/9 10	V/2 6	V/10 14	III/7 6	IV/8 14	—	—	VII/4 25
[illegible] 47	II/10 30	VII/11 39	V/11 25	V/6 26	V/11 16	VI/12 32	IV/9 13	V/4 15	V/10 14	III/1 3
[illegible] 41	IV/9 19	VI/10 34	IV/11 19	VII/8 24	V/10 19	V/9 18	VI/9 30	—	IV/12 14	VIII/4 18
[illegible] 39	V/12 20	V/10 27	VI/11 34	VII/9 51	IV/11 18	IV/9 11	III/8 7	III/4 10	IV/11 12	VIII/3 18
[illegible] 46	III/9 11	VI/11 38	VI/11 17	VI/11 34	IV/11 12	VI/11 19	VI/12 21	II/4 7	III/11 8	VIII/5 29
[illegible] 34	IV/9 15	VI/10 34	V/9 31	VIII/7 45	IV/9 11	III/6 6	VI/5 22	IV/1 4	IV/10 12	III/1 3
[illegible] 42	II/9 14	VI/9 32	IV/9 21	VI/7 25	IV/9 17	IV/8 11	IV/8 11	—	II/6 4	VI/3 10
[illegible] 48	VI/11 27	VI/11 42	VII/11 45	VII/10 47	VI/11 19	V/9 15	V/10 13	III/4 11	V/11 17	VII/4 19
[illegible]10 54	V/11 16	VI/11 39	VI/12 36	VII/11 44	V/12 19	V/11 18	V/11 19	III/3 8	IV/11 11	IX/5 34
[illegible] 39	III/9 16	VI/11 37	VI/12 26	V/9 28	IV/9 13	II/7 4	IV/9 16	III/3 8	IV/9 14	III/2 4
[illegible] 40	III/8 11	IV/9 32	IV/9 32	VI/7 35	II/7 12	IV/8 15	V/9 23	III/2 5	III/12 19	IX/4 19
[illegible] 41	V/12 33	VI/10 32	IV/9 14	VI/3 10	VI/10 24	IV/9 16	V/9 9	VIII/2 8	V/10 15	—
[illegible] 55	—	VI/10 40	III/9 11	VII/2 9	IV/9 8	III/7 9	VII/1 7	—	—	—
[illegible] 29	V/9 17	VI/12 35	VI/10 34	V/7 20	VI/12 24	VII/12 32	VII/12 25	VIII/9 30	VI/12 23	IV/1 4
[illegible] 32	—	V/9 26	—	III/1 2	VI/10 15	IV/10 20	—	—	—	III/2 2
[illegible] 43	II/10 24	V/11 33	VI/10 24	VII/12 59	V/10 24	VII/12 33	V/11 36	VI/2 5	VI/12 28	V/3 13
[illegible] 35	—	III/8 15	III/7 4	III/1 3	III/8 7	—	—	—	—	—
[illegible] 37	IV/9 15	VI/10 41	V/10 25	IV/5 15	V/10 21	VI/9 16	VI/9 23	IX/3 12	VI/12 29	VI/2 9
[illegible]/5 26	III/8 12	I/9 8	III/3 7	II/8 7	—	—	--	—	—	—

Tabe

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im rein. Serum	p_H	Proz. Eiweiß im Hbserum		$HgCl_2$	$Cd(NO_3)_2$	Sulfosalicylsäure	Phosphorwolframsäure
1	Sau	etwa 8 Monate	Gesund Gut gefüttert	7,632	5,4	4,894 15	R. S. Hbs.	VII/11 60 VIII/12 73	VII/11 62 VII/11 63	VIII/10 47 IX/8 48	VI/10 52 X/12 92
2	Verschn. Schwein	8 Monate	Gesund Gut gefüttert	9,136	5,4	4,828 46	R. S. Hbs.	VII/11 62 VI/12 60	VI/12 55 VII/12 78	VII/9 31 IX/7 37	VII/11 53 IX/11 77
3	Verschn. Schwein	$1^1/_2$ Jahre	Gesund Gut gefüttert	7,1568	5,8	4,894 15	R. S. Hbs.	VII/10 59 VIII/12 79	VI/10 79 VIII/12 74	VIII/11 51 VIII/8 39	VI/9 44 IX/12 86
4	Sau	2 „	Gesund Gut gefüttert	9,307	5,6	6,5184	R. S. Hbs.	VII/10 60 VII/12 67	VII/11 63 VIII/12 78	X/8 47 X/8 49	VI/9 46 VIII/11 70
5	Sau	etwa 2 Jahre	Gesund Gut gefüttert	8,9648	6,0	5,311 316	R. S. Hbs.	VII/11 63 VII/12 57	VI/12 59 VII/12 66	VII/11 44 VIII/10 49	VI/10 50 IX/11 80
6	Sau	$2^1/_2$ Jahre	Gesund Gut gefüttert	9,029	5,8	8,4498	R. S. Hbs.	VIII/11 76 VII/12 69	VII/11 63 VIII/12 79	IX/8 38 IX/9 43	VIII/9 62 VII/10 64
7	Sau	3 „	Gesund Gut gefüttert	8,064	5,6	7,921 59	R. S. Hbs.	VII/10 57 VII/12 73	VI/10 52 V/11 45	VIII/6 31 VIII/7 28	VII/9 48 IX/9 72
8	Sau	3 „	Gesund Gut gefüttert	9,35	5,8	5,794 15	R. S. Hbs.	VIII/12 80 VI/12 54	VII/12 64 VII/12 63	IX/11 50 VIII/10 50	VIII/11 65 IX/12 91
9	Sau	$3^1/_2$ „	Gesund Gut gefüttert	10,935	5,8	5,794 15	R. S. Hbs.	VII/12 69 VII/12 65	VI/11 58 VII/11 65	VII/9 37 IX/8 45	VI/10 50 VII/12 72
10	Eber	4 „	Gesund Mittel gefütt.	8,7936	5,4	7,725 53	R. S. Hbs.	VII/12 74 VI/12 59	VI/11 56 VII/12 69	VIII/10 43 VIII/11 49	VII/10 58 VIII/11 72

Tabe

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im rein. Serum	p_H	Proz. Eiweiß im Hbserum		$HgCl_2$	$Cd(NO_3)_2$	Sulfosalicylsäure	Phosphorwolframsäure
1	Wolfshund	etwa 1 Jahr	Gesund Gut gefüttert	8,3014	—	5,311 306	R. S. Hbs.	VIII/12 81 VI/12 54	VI/12 61 V/10 42	VII/10 43 IX/8 48	VII/10 58 VIII/11 66
2	Spitz	$1^1/_2$ Jahre	Gesund Gut gefüttert	5,5314	—	5,157 152	R. S. Hbs.	VI/11 55 VI/11 49	VI/12 59 IV/9 31	VIII/9 40 IX/8 50	VI/11 54 VII/10 61
3	Spitz	etwa 2 Jahre	Gesund Gut gefüttert	7,113	—	4,345 61	R. S. Hbs.	VI/11 55 VII/11 60	V/11 45 V/11 43	VIII/11 53 VII/8 37	VII/10 59 VI/10 51
4	Dobermann	2 Jahre	Gesund Mittel gefütt.	6,768	—	3,43	R. S. Hbs.	VII/10 57 V/10 42	VI/12 60 III/8 16	IX/8 41 VIII/7 32	VII/10 57 VI/10 44
5	Schäferhund	$2^1/_2$ „	Gesund Gut gefüttert	8,494	—	7,242 69	R. S. Hbs.	VII/9 52 VI/11 47	VI/10 53 VI/9 46	IX/10 46 VII/9 39	VII/10 60 VI/10 51

ncserum.

	Pikrinsäure	K Cr(SO$_4$)$_2$	K Al(SO$_4$)$_2$	Fe$_2$(SO$_4$)$_3$	FeSO$_4$	FeCl$_3$	Chloressigsäure	Trichloressigsäure	Acetaldehyd	Milchsäure	Pyrogallol
0	VII/7 36	IV/10 22	VI/12 46	V/11 29	VI/10 37	V/11 29	III/8 8	IV/9 17	—	III/10 10	VIII/3 20
5	VIII/7 44	IV/10 19	V/11 38	V/10 25	VII/12 36	V/10 26	III/7 7	IV/9 19	—	III/9 7	VIII/5 32
4	VII/8 38	IV/10 21	VI/11 39	V/11 25	VI/10 45	V/11 20	IV/10 16	III/9 12	III/6 12	III/11 13	VIII/4 24
4	VIII/8 46	V/10 23	VI/11 32	VI/12 33	V/10 34	V/11 21	IV/11 22	V/11 24	II/5 7	III/11 9	VIII/5 34
0	VI/7 348	III/10 14	V/11 24	IV/11 26	VI/10 37	V/11 27	IV/9 12	IV/8 12	II/2 4	III/10 11	VIII/4 22
1	VIII/8 46	III/9 14	VI/11 28	V/11 24	V/10 29	VI/11 26	III/9 10	III/8 12	—	III/10 10	VIII/5 28
9	VIII/7 48	V/10 32	VI/11 44	V/10 32	VIII/8 34	V/9 17	IV/11 22	V/9 23	V/3 12	IV/10 16	VIII/4 39
4	VIII/8 49	V/9 20	V/10 34	IV/10 26	VI/7 22	IV/10 16	II/11 13	III/11 23	III/2 6	III/9 8	VIII/3 21
5	VII/7 37	V/10 26	VII/11 34	V/11 32	VI/11 47	V/11 18	V/9 15	V/11 24	III/5 14	IV/11 12	VI/4 18
2	VIII/7 47	III/9 12	VII/12 31	IV/10 22	IV/9 31	IV/10 18	IV/9 13	IV/8 19	III/4 10	III/11 12	VII/5 27
9	VIII/8 54	V/11 27	V/11 35	V/10 28	VIII/9 44	V/11 19	IV/11 20	IV/10 23	VI/2 8	V/9 15	VII/2 13
1	VIII/8 50	IV/7 12	V/10 34	IV/10 20	VII/7 26	V/10 21	III/9 15	III/8 16	II/2 4	III/10 11	VIII/3 20
3	VI/7 33	III/8 12	V/10 24	III/7 14	V/3 10	II/7 5	II/6 5	VI/6 17	—	IV/9 9	VI/1 5
9	VI/6 28	—	—	III/10 13	V/4 13	IV/9 12	—	IV/2 5	—	—	VII/4 13
7	VII/8 39	IV/10 18	V/11 23	V/11 24	VI/11 46	IV/11 12	V/10 18	V/10 23	III/5 11	IV/11 12	VII/4 21
6	VIII/8 44	IV/9 17	V/11 28	V/11 31	VII/11 41	IV/11 4	IV/10 17	IV/9 19	III/5 12	III/11 11	VIII/5 32
4	VII/9 47	IV/11 13	V/11 31	V/11 24	IV/11 44	V/11 23	IV/10 14	V/11 23	I/3 3	IV/11 18	VII/4 23
8	VIII/8 46	IV/10 16	V/11 30	V/11 23	IV/10 35	V/11 26	IV/9 8	V/10 26	I/2 2	III/11 11	VIII/5 29
5	VII/7 37	V/10 30	VI/11 38	VI/11 30	VI/11 13	VI/11 23	V/10 16	V/10 21	III/5 11	V/11 23	VII/4 21
1	VII/7 43	V/10 20	V/11 20	V/12 26	V/12 36	VI/11 21	V/11 18	V/10 20	II/4 7	IV/11 12	VIII/5 34

rum.

	Pikrinsäure	K Cr(SO$_4$)$_2$	K Al(SO$_4$)$_2$	Fe$_2$(SO$_4$)$_3$	FeSO$_4$	FeCl$_3$	Chloressigsäure	Trichloressigsäure	Acetaldehyd	Milchsäure	Pyrogallol
[illegible]	VII/8 39	V/11 29	VI/12 45	V/10 24	V/9 37	V/11 22	V/10 23	V/11 24	IV/6 17	V/11 21	VII/5 29
51	VIII/8 47	IV/10 16	V/11 43	V/11 34	V/8 28	V/11 26	IV/13 13	III/7 14	II/4 5	III/10 13	VIII/5 29
6	VII/7 37	III/8 9	V/9 36	V/11 99	VI/11 41	IV/10 15	IV/7 8	III/9 9	III/3 8	IV/10 12	VI/2 9
62	VII/7 37	III/9 9	IV/9 16	III/9 13	III/4 10	II/8 7	II/7 6	II/6 5	II/3 7	II/9 6	VII/3 16
[illegible]	VII/7 35	VI/8 14	V/9 22	V/11 30	V/11 33	V/10 19	IV/8 12	V/9 15	—	IV/10 11	VII/3 19
[illegible]	VII/7 35	III/8 14	IV/10 21	IV/11 18	IV/9 24	IV/9 10	II/8 6	II/9 8	—	IV/10 15	IX/4 24
[illegible]	VII/6 35	VI/10 23	IV/11 43	VI/11 39	VI/9 42	V/11 21	III/9 14	IV/9 15	IV/5 17	V/11 20	VIII/2 11
[illegible]	VII/6 30	V/9 13	III/9 19	II/10 5	—	—	—	—	—	—	—
[illegible]	VII/8 39	V/10 24	VI/9 32	VI/11 45	V/9 31	V/11 26	V/9 19	V/9 16	IV/4 14	IV/10 14	VII/3 13
61	VII/8 37	III/9 16	III/10 17	IV/11 22	III/6 14	III/10 13	II/8 5	II/9 7	III/3 7	III/10 11	VIII/3 18

Tabelle V. $AgNO_3$.

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im reinen Serum	p_H	Proz. Eiweiß im Hbserum	Proz. Salze		$AgNO_3$	
1.	Wallach	9 Jahre	Gesund Gut gefüttert	7,74	6,0	4,346 614	0,039 368 0,024 472	R. S. Hbs.	VII/9 VIII/12	53 74
2.	„	15 „	Gesund Mittel gefütt.	8,28	5,4	5,311 306	0,057 456 0,021 28	R. S. Hbs.	IX/9 IX/11	72 72
3.	„	etwa 20 Jahre	Gesund Mittel gefütt.	8,172	5,6	6,276 998	0,052 136 0,025 004	R. S. Hbs.	IX/10 VII/10	73 61
4.	Stute	20 „	Gesund Sehr schl. gef.	8,815	6,2	6,276 998	0,038 836 0,014 896	R. S. Hbs.	VIII/11 VIII/12	71 76
5.	Hund (Wolfshund)	1 „	Gesund Gut gefüttert	8,3014	—	5,311 306	0,040 64 0,034 58	R. S. Hbs.	VIII/9 VIII/10	61 66
6.	Hund (Spitz)	etwa 2 Jahre	Gesund Gut gefüttert	7,113	—	4,345 61	0,041 76 0,030 24	R. S. Hbs.	X/10 X/10	83 89
7.	Sau	8 Mon.	Gesund Gut gefüttert	7,632	5,4	4,894 115	0,046 816 0,044 688	R. S. Hbs.	X/9 X/9	51 61
8.	Verschn. Schwein	8 „	Gesund Gut gefüttert	9,136	5,4	4,828 46	0,051 136 0,030 324	R. S. Hbs.	X/10 VIII/11	80 72
9.	Verschn. Schwein	$1^1/_2$ Jahre	Gesund Gut gefüttert	7,1568	5,8	4,894 15	0,046 284 0,038 304	R. S. Hbs.	VIII/9 IX/9	51 59
10.	Sau	2 „	Gesund Gut gefüttert	8,9648	6,0	5,311 316	0,045 752 0,028 728	R. S. Hbs.	VII/9 VII/9	49 51
11.	„	3 „	Gesund Gut gefüttert	9,35	5,8	5,794 152	0,046 816 0,029 26	R. S. Hbs.	IX/8 IX/10	55 67
12.	„	$3^1/_2$ „	Gesund Gut gefüttert	10,935	5,8	5,794 152	0,043 892 0,025 024	R. S. Hbs.	XI/9 IX/10	74 63
13.	Eber	4 „	Gesund Mittel gefütt.	8,7936	5,4	7,725 53	0,050 008 0,026 068	R. S. Hbs.	VIII/9 VIII/9	56 58

Tabelle VI. Alkoholische Fällungsmittel.

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im Serum	n/D	p_H	Konzentrierter Äthylalkohol	Konzentrierter Methylalkohol	Konzentriertes Aceton	0,5 m Furfurol	8.5 m Aceton
1	Kalbin	2 Jahre	Gesund, gut gefüttert	7,4592	1,348 804	6,0	VI/4 20	VII/4 24	VII/6 24	IX/7 42	IX/6 37
2	Ochse	4 „		8,1750	1,350 025	6,0	VI/4 19	VII/4 22	VI/6 23	IX/6 32	VIII/7 33
3	„	6 „		6,8644	1,347 758	6,8	VI/4 15	V/3 13	VIII/6 31	VIII/6 21	IX/8 44
4	„	7 „		7,6320	1,349 100	7,0	VII/4 19	V/4 15	VIII/8 42	IX/7 33	IX/7 41
5	Kuh	7 „		8,0640	1,349 840	5,6	VI/4 20	VII/5 26	VIII/7 37	IX/7 30	X/8 54
6	Ochse	7½ „		7,2000	1,348 360	5,4	VII/4 22	VII/5 24	VIII/8 44	VIII/7 39	IX/10 61
7	„	8 „		8,7722	1,350 610	5,8	VII/4 21	VII/4 21	VII/7 34	X/8 34	X/9 60
8	Kuh	9 „		7,9560	1,349 650	6,6	V/4 15	VII/4 23	IX/8 51	IX/6 34	IX/6 39

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im Serum	n/D	p_H	Konzentrierter Äthylalkohol	Konzentrierter Methylalkohol	Konzentriertes Aceton	0,5 m Furfurol	8,5 m Aceton
1	Sau	8 Mon.	Gesund, gut gefüttert	8,5368	1,350 650	6,0	VI/3 14	VI/4 20	VIII/8 46	VIII/7 39	IX/7 45
2	Verschn. Schwein	9 „		9,1390	1,389 690	5,8	VI/4 17	VI/3 15	VII/6 25	IX/6 37	IX/6 34
3	„	9 „		10,1344	1,353 410	5,4	V/2 7	VI/4 18	VIII/6 36	X/7 41	IX/6 33
4	„	1 Jahr		9,2216	1,351 830	6,0	VI/3 11	VII/4 20	VIII/6 25	IX/6 33	VIII/6 31
5	„	2 Jahre		8,4940	1,350 580	6,2	V/3 12	VI/4 18	IX/8 52	IX/6 33	VIII/7 36
6	Sau	2 „		8,1720	1,350 025	5,8	IV/3 8	VI/4 16	VIII/6 34	X/7 40	IX/8 52
7	„	4 „		9,4560	1,352 230	6,2	VI/5 15	VII/5 23	IX/8 52	VIII/5 26	IX/7 42
8	„	4½ „		9,3500	1,352 050	6,2	V/4 16	VII/4 22	IX/9 59	IX/6 32	IX/6 36

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im Serum	n/D	p_H	Konzentr. Äthylalkohol	Konzentr. Methylalkohol	Konzentr. Aceton	0,5 m Furfurol	8,5 m Aceton
1	Wallach	$^3/_4$ J.	gesund, g. gef.	6,336	1,34687	6,6	V/3 13	VII/5 25	VIII/7 34	IX/7 42	IX/6 39
2	„	9 J.	ges., schl. gef.	7,524	1,348915	6,4	V/4 16	VII/5 29	VIII/7 34	IX/8 40	IX/6 35
3	Stute	9 J.	ges., s. g. gef.	6,7248	1,34753	6,4	V/4 16	VII/6 33	VIII/8 46	IX/8 49	IX/8 51
4	„	10 J.	ges., mitt. gef.	7,2648	1,34847	6,8	VI/4 18	VII/5 26	VIII/7 32	VIII/7 36	VIII/9 52
5	„	12 J.	ges., mitt. gef.	6,9408	1,347906	5,8	VI/4 20	VI/5 21	VIII/7 37	VIII/6 30	VIII/7 41
6	Wallach	14 J.	ges., schl. gef.	6,8112	1,34768	7,0	VI/3 15	V/3 13	VII/6 28	IX/6 34	VIII/7 42
7	Stute	15 J.	„ „ „	6,736	1,34753	6,0	VI/4 19	VI/5 24	VII/6 30	VII/6 24	VIII/8 46
8	Wallach	über 20 J.	gesund, s. schl. gef.	7,956	1,34965	6,4	VI/4 20	VII/5 27	VIII/8 41	VIII/7 40	IX/7 42

Nr.	Art	Alter		Proz. Eiweiß im Serum	n/D	p_H	Konzentr. Äthylalkohol	Konzentr. Methylalkohol	Konzentr. Aceton	0,5 m Furfurol	8,5 m Aceton
1	Hündin, Schäfer	1 J.	gesund, g. gef.	6,6816	1,34746	5,8	VI/3 15	VII/5 28	VII/6 33	IX/5 29	IX/6 31
2	Hund, Dobermann	1 J.	„ m. „	6,984	1,34798	6,0	V/4 16	V/4 16	VII/6 30	VIII/8 44	VIII/7 42
3	Hündin, Dobermann	$1^1/_2$ J.	„ g. „	6,6	1,35065	6,0	V/4 15	V/4 14	VI/6 26	VIII/6 32	VIII/7 42
4	Hund	2 J.	„ „ „	6,7348	1,34753	6,0	VI/3 13	VI/4 18	VII/6 28	IX/6 32	IX/6 34
5	„	2 J.	„ „ „	7,6968	1,349211	6,0	V/3 12	V/3 13	VII/8 50	IX/5 29	IX/6 42
6	Hund, Spitz	2 J.	ges., s. g. gef.	6,3792	1,34694	6,4	V/3 12	V/4 16	VII/7 39	VIII/8 45	VIII/8 48
7	Hund, Dobermann	$2^1/_2$ J.	ges., mittel gef.	6,984	1,34718	6,2	VI/4 18	VI/4 18	IX/11 58	IX/6 40	X/6 39
8	„ „	3 J.	„ „ „	6,768	1,34761	5,8	VI/4 16	VI/4 17	VI/8 49	VIII/6 33	IX/8 52
9	Hund, Schäfer	3 J.	ges., s. g. gef.	7,74	1,349285	6,0	VI/3 14	VI/3 15	VII/6 33	VIII/8 45	IX/7 42

Durchschnittszahlen der Gerinnungskraft.

Art		$HgCl_2$	$Cd(NO_3)_2$	Sulfosalicylsäure	Phosphorwolframsäure	Gerbsäure	$CuSO_4$	Pikrinsäure	$KCr(SO_4)_2$	$KAl(SO_4)_2$	$Fe_2(SO_4)_3$	$FeSO_4$	$FeCl_3$	Chloressigsäure	Trichloressigsäure	Acetaldehyd	Milchsäure	Pyrogallol	Resorcin	Phenol	Chloralhydrat
Schwein	R. S.	66	58	42	51	62	62	50	21	34	26	37	19	15	19	9	14	19	—	11	—
	Hbs.	66	68	44	77	81	72	44	17	39	24	30	20	14	18	7	10	27	—	26	—
	Differenz	—	+ 10	+ 2	+ 26	+ 19	+ 10	— 6	— 4	— 4	— 2	— 7	+ 1	— 1	— 1	— 2	— 4	+ 8	—	+ 15	—
Hund	R. S.	60	56	45	58	57	66	37	20	36	33	37	21	15	16	14	16	16	—	—	—
	Hbs.	50	36	41	55	75	60	37	14	23	18	19	14	10	8	6	11	22	—	—	—
	Differenz	— 10	— 20	— 4	— 3	+ 18	— 6	—	— 6	— 13	— 15	— 18	— 7	— 5	— 8	— 8	— 5	+ 6	—	—	—
Pferd	R. S.	67	57	36	59	66	64	30	19	40	27	30	20	13	17	10	13	16	3	—	—
	Hbs.	74	71	39	66	79	70	41	13	30	20	22	15	12	16	8	10	22	—	—	—
	Differenz	+ 7	+ 14	+ 3	+ 7	+ 13	+ 6	+ 2	— 6	— 10	— 7	— 8	— 5	— 1	— 1	— 2	— 3	+ 6	— 3	—	—
Rind	R. S.	64	53	37	53	56	61	39	22	36	31	32	19	19	17	11	18	9	8	—	9
	Hbs.	72	57	45	69	73	75	41	14	29	17	21	14	13	14	7	11	20	—	—	—
	Differenz	+ 8	+ 4	+ 8	+ 16	+ 17	+ 15	+ 2	— 8	— 7	— 14	— 11	— 5	— 6	— 3	— 4	— 7	+ 11	— 8	—	— 9

Die Fällungsbilder mit $Fe_2(SO_4)_3$ und $FeCl_3$ sind beim reinen Schweineserum von jungen und alten Individuen übereinstimmend; auch das Hämoglobinserum zeigt in dieser Richtung keine Unterschiede. Die Fällungsbildertypen des Pferdeserums von $FeCl_3$ gleichen den von organischen Säuren (Milch-, Chloressig- und Trichloressigsäure). Beim Rinderserum sind einige Unterschiede der Bilder von diesen zwei Fällungsmitteln in beiden Richtungen der Verdünnung zu sehen. $FeSO_4$ fällt aus allen Fe-Salzen das reine Serum aller Tierarten am meisten. Die Koagulationskraft des Ferrosulfats, Ferrisulfats und Ferrichlorids ist beim Hämoglobin-, Pferde- und Rinderserum gegenüber der bei reinem Serum sehr erniedrigt; dasselbe gilt für das Schweineserum, wo nur das Ferrichlorid eine Ausnahme bildet. Das Hundeserum hat konstante Typen.

Durch m/10 Salpetersäure wurde weder das reine noch das Hb-Serum aller Tierarten ausgefällt.

Tannin verhält sich zu einzelnen Blutseren verschieden. Beim reinen Pferdeserum wird die Koagulationsfähigkeit mit dem steigenden Alter des Tieres größer, im höchsten Alter aber schwindet diese Regelmäßigkeit. Beim Rinderserum sinkt sie mit dem steigenden Alter und es läßt sich da ein gewisser Zusammenhang zwischen der Serumsacidität und der Koagulationszahl wahrnehmen. (Bei der Acidität von p_H 6 ist die Koagulationszahl 64, bei der Acidität von p_H 5,4 ist sie 54.) Die Fällungsbilder vom reinen Schweineserum sind zwar typisch für dieses hier, aber irgend ein Einfluß des Alters oder Geschlechts auf die Koagulation läßt sich nicht nachweisen. Beim Hundeserum steigt die Fällung mit dem steigenden Tieralter; dieselben Verhältnisse kommen auch beim Hb-Serum, nur ist die Koagulationszahl immer noch größer als bei reinem.

Typisch stufenförmige Fällungsbilder hat die Sulfosalicylsäure sowohl beim reinen als auch beim Hb-Serum aller vier Tierarten. Auffallende Unterschiede übt das Rinderserum aus: das Hb-Serum junger Individuen koaguliert weniger als das reine, während es bei älteren Tieren umgekehrt ist. Die Koagulationszahl des Hb-Serums aller vier Tierarten ist hier größer als die des reinen Serums.

Die Pikrinsäure zeigt bei reinen Seren aller vier Tierarten einen unveränderten Typ. Der Einfluß des steigenden Alters äußert sich beim Schweine bis zu 3 Jahren durch eine Vergrößerung der Koagulation des reinen Serums, beim Pferde auch durch eine Steigerung beim Hb-Serum, beim Rind durch eine Senkung; beim Hunde ist es nicht so markant ausgeprägt. Die Koagulationszahl des Hb-Serums ist beim Pferde und Rinde größer als die des reinen Serums, beim Schweine um sechs Felder kleiner, und beim Hunde ist kein Unterschied.

Die Koagulationskraft der Milch-, Chloressig- und Trichloressigsäure ist bei reinem Serum nicht an dessen größte Konzentration gebunden (mit seltenen Ausnahmen beim Rinderserum). Die Koagulationskraft der Milchsäure steigt regelmäßig mit dem zunehmenden Alter des Schweines. Die Fällungsbilder der Chloressig- und Trichloressigsäure beim Hunde sind durch ihre hintere Grenze in der Richtung der Fällungsmittelverdünnung typisch. Beim Hb-Serum bleibt der Fällungstypus derselbe, nur die Koagulationszahl ist mäßig herabgesetzt (gesunken). Beim Rinde ist die Fällungskraft der Chloressig- und Trichloressigsäure bis zum Alter von 2½ Jahren am besten, dann sinkt sie allmählich und bei noch älteren ist sie überhaupt gleich Null. Die Milchsäure fällt das Hb-Serum weniger

als das reine, bei Tieren bis zu 3 Jahren sogar überhaupt nicht, trotzdem das reine Serum in diesem Alter die größten Koagulationszahlen aufweist.

Die Carbolsäure fällt weder das reine noch das Hb-Serum vom Pferde, Rinde und Hunde, das Schweineserum nur in einem Falle (Versuch 7, Sau, 3 Jahre alt).

Die Fällungskraft des Pyrogallols ist sehr unregelmäßig, obwohl die Fällungsbilder ihren Typus bewahren. Beim reinen und Hb-Serum des Pferdes steigt die Fällung mit zunehmendem Alter. Das reine Serum von jungen Rindern sowie auch das Hb-Serum alter Rinder werden überhaupt nicht gefällt. Beim Schweineserum bestehen gewisse Schwankungen im mittleren Alter der Tiere. Die Koagulationszahl des Hb-Serums ist durchaus größer als die des reinen.

Der Acetaldehyd kann in allgemeinen als ein schwaches Fällungsmittel angesehen werden; er besitzt eine niedrige, beträchtlich schwankende Koagulationszahl. In einigen Fällen koaguliert weder das reine noch das Hb-Serum. Die Koagulationszahl des Hb-Serums ist kleiner als die des reinen.

Die Versuche mit Resorcin und Chloralhydrat sind ebenfalls von diversen Erfolgen. Resorcin fällt das reine Rinderserum nur im Versuche 8, 9 und 10; Chloralhydrat nur im Versuch 7, 8 und 9; alle übrigen Fällungsversuche sind überhaupt ohne Erfolg geblieben.

m/10 Äthylalkohol fällte die Seren aller vier Tierarten nicht; das Studium seiner Fällungskraft ist erst in höheren Konzentrationen möglich.

Weiter verfolgte *Reiner*, inwiefern die Anwesenheit der Chloride im Blute die Serumfällungsfähigkeit beeinflußt. Die Chloridmenge in reinem und auch Hb-Serum wurde durch die Titrationsmethode *Votočkas* festgestellt. Sonst wurde mit 1proz. Serum und einer m/10 Lösung von $AgNO_3$ gearbeitet. Der Kontrolle wegen benutzte *Reiner* physiologische Lösung von 0,85proz. NaCl; diese Kontrolle sowie das betreffende geometrisch verdünnte Serum wurden von dem mit $AgNO_3$ gefällten Felde subtrahiert, und so konnte die Fällungskraft von $AgNO_3$ beurteilt werden.

Die Blutchloride nehmen an der Fällung nur einen sehr geringen Anteil. Die Fällungsbilder des reinen und des Hb-Serums mit $AgNO_3$ sind dem Tannintypus ähnlich. Eine Erhöhung der Fällung durch das Alter wurde nur beim Pferde festgestellt; ein Einfluß des Geschlechts, der Serumacidität und des Ernährungszustandes des Tieres konnte bei Versuchen mit $AgNO_3$ nicht bestätigt werden. Beim Hb-Serum bemerkte man ein auffallend kleineres Quantum der Chloride als beim reinen Serum und ein Steigen der Fällungsfähigkeit gegen das reine Serum.

Weiter arbeitete *Hányš* mit konzentriertem Äthylalkohol, Methylalkohol, Aceton, 8,5 mol. Aceton und m/10 Furfurollösung in 3 mol. Äthylalkohol, welcher schon normales, unverdünntes Blutserum nicht mehr fällt. Er arbeitete mit konzentriertem, reinem Blutserum des Pferdes, Rindes, Schweines und Hundes auf hohlgeschliffenen Gläsern, die man in der Bakteriologie für Untersuchung in hängenden Tropfen verwendet.

Die Fällungsbilder mit konzentriertem Äthylalkohol sind sehr unregelmäßig; die größte Koagulationszahl ist beim Rinderserum 19.

Methylalkohol ist das schwächste Fällungsmittel der Seren aller vier Tierarten. Die Koagulationszahl sinkt deutlich mit der steigenden Serumacidität.

Größere Koagulationszahlen weist der Methylalkohol auf. Der Fällungsbildertypus des Rinder-, Schweine- und Hundeserums bleibt ähnlich,

aber der beim Pferde sticht so ab, daß man Methylalkohol deswegen und auch wegen seiner starken Fällungskraft als Spezifikum für die Pferdeserumkoagulation empfehlen kann. Die Koagulationszahl aller Tierarten sinkt mit der steigenden Acidität der Seren.

Das konzentrierte und 8,5 mol. Aceton bewahren bei allen Tierarten einen konstanten Typus; das 8,5 mol. Aceton hat aber noch meistenteils eine stärkere Fällungskraft als das konzentrierte, indem das erstere noch in einer Konzentration von 0,0166, dieses nur bis 0,0625 fällt.

Das 0,5 mol. Furfurol gibt gleichfalls große Fällungsbilder.

Irgend ein Einfluß der Serumacidität auf die Koagulationszahl ließ sich bei diesen drei Fällungsmitteln nicht nachweisen.

Literatur.

Die vorigen Mitteilungen in dieser Zeitschr.: I. Mitt. **137**, 456; II. Mitt. **138**, 326; III. Mitt. **138**, 335; IV. Mitt. **145**, 98. Biologické spisy vys. školy zvěrolékařské 1922 bis 1925.

Weitere Untersuchungen über den Einfluß der sogenannten Carnosinfraktion des Fleischextraktes auf die Sekretion der Magendrüsen.

Von

R. Krimberg und **S. A. Komarow.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Riga.)

(Eingegangen am 18. Februar 1926.)

Schon vor mehr als 10 Jahren hat der eine von uns die Meinung ausgesprochen, daß die damals vor kurzem neu entdeckten stickstoffhaltigen Basen des Fleischextrakts, nämlich das Carnosin, Carnitin und Methylguanidin, welche mittlerweile auch aus dem Muskelgewebe als dessen präformierte Bestandteile isoliert worden waren[1]), gleich dem schon früher als physiologisch aktiv erkannten Cholin, eventuell die Rolle dynamischer Erreger bzw. Hormone im Organismus spielen könnten. Folglich war das gesamte Muskelsystem des Organismus als ein weit verbreitetes Organ der inneren Sekretion, in welchem unter anderen sehr wichtige und zum Teil sehr aktive Hormone für die Tätigkeit der Verdauungsdrüsen produziert werden, anzusehen. In Anbetracht ihrer Menge schien es sogar nicht ausgeschlossen zu sein, daß die sogenannte „psychische" Sekretion in letzter Linie ebenfalls durch die Einwirkung dieser sowie auch anderer im Blute zirkulierender Hormone hervorgerufen wird. Die ersten diesbezüglichen experimentellen Versuche waren schon im Jahre 1910 (in Charkow) unter Beteiligung des Herrn Dr. *Borodenko* an Hunden mit dem „kleinen" Magen nach *Heidenhain-Pawlow* angestellt worden und hatten nämlich gezeigt, daß das Carnitinchlorid, subkutan appliziert, ohne Zweifel auf die Magendrüsen excitosekretorisch einzuwirken imstande ist[2]).

In den zitierten Arbeiten vertritt der eine von uns die zuerst von *A. Bickel* geäußerte Ansicht, nämlich, daß die Extraktivstoffe der

---

[1]) *R. Krimberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 412, 1906.

[2]) *Derselbe*, a) Über das Carnitin und seine physiologische Rolle. Festschrift für Prof. Dr. *S. A. Popoff*. Charkow 1913. b) Zur Frage über den Mechanismus der Magensekretion. Charkow 1915. c) Die Hormone usw. Charkow 1918.

Fleischnahrung ihre excitosekretorischen Fähigkeiten hauptsächlich erst nach deren Resorption, also auf humoralem Wege zur Entfaltung bringen könnten. In diesen Arbeiten, in welchen die Hauptelemente zu einer neuen Theorie der Drüsentätigkeit zum ersten Male angegeben sind[1]), werden unter anderem auch die möglichen Gründe besprochen, welche dazu haben führen können, daß von manchen sogar sehr namhaften Laboratorien aus der Fleischextrakt und speziell der *Liebig*sche Fleischextrakt für unfähig erklärt worden ist, auf humoralem Wege Sekretionen der Verdauungsdrüsen hervorzurufen. Es ist in denselben eingehend darauf hingewiesen worden, daß bei subkutaner und ganz besonders intravenöser Applikation des Fleischextraktes der sekretionserregende Effekt in hohem Grade von der Darstellungsweise des Extraktes abhängig ist, und daß speziell in jedem käuflichen Fleischextrakt, wie z. B. im *Liebig*schen, stets in bedeutender Menge Stoffe vorkommen müssen, welche unter normalen Verhältnissen im Blute des Versuchstieres niemals enthalten sind, welche aber nach deren Einführung ins Blut die excitosekretorische Wirkung der intravitalen Muskelhormone stören und unter Umständen dieselbe sogar vollständig hemmen können. Es dürfte sich dabei in erster Linie wohl um einige hochmolekulare Stoffe von kolloidalem Charakter handeln, deren Eliminierung vor dem Gebrauch des Extraktes durchaus notwendig ist. Um dies zu erreichen, sowie um eine weitere Reinigung der Muskelextrakte von Salzen und eventuell auch noch von einigen anderen Stoffen durchzuführen, hat der eine von uns den Vorschlag gemacht, die excitosekretorischen Hormone unter Anwendung irgend einer bekannten Fraktionierungsmethode aus dem Rohextrakt herauszulösen und dieselben in gewissen Fraktionen zu konzentrieren[2]). Da es sich bereits schon damals erwiesen hatte, daß die excitosekretorisch aktiven Muskelhormone wenigstens zum großen Teil den Charakter organischer Basen besitzen, von welchen zurzeit das Carnosin, Methylguanidin und Carnitin, sowie das Cholin als die bestbekannten Repräsentanten gelten, so schien es natürlich am zweckmäßigsten, vor allem den Phosphorwolframsäureniederschlag des Fleischextraktes zu benutzen, aus demselben die entsprechenden Carnosin-, Methylguanidin- und Carnitinfraktionen, z. B. nach der von *Gulewitsch* und *Krimberg* ausgearbeiteten Methode, darzustellen und zwecks Einverleibung bei Versuchstieren anzuwenden[3]).

---

[1]) In ihrer neuesten Form ist diese Theorie vor kurzem in dieser Zeitschr. 157, 187, 1925 (*R. Krimberg*) veröffentlicht worden.

[2]) *R. Krimberg*, Die Hormone usw., S. 16ff. Charkow 1918.

[3]) *Derselbe*, Über die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Muskeln. Inaugural-Diss., S. 115ff. Moskau 1907. Hoppe-Seyler-Thierfelders Handb. d. physiol-chem. Analyse 1909, S. 758.

Wir erlauben uns hier, die im hiesigen Laboratorium bis jetzt angewandte Darstellungsmethode der Carnosinfraktion an der Hand eines konkreten Beispiels kurz zu schildern. Es handelt sich nämlich um die Isolierung dieser Fraktion aus ganz frischem Muskelfleisch, sowie aus *Liebig*schem Fleischextrakt zwecks Einverleibung bei Hunden in den weiter anzuführenden Versuchen.

Darstellung der Carnosinfraktionen.

3½ kg Ochsenfleisch, sorgfältigst von Sehnen und Fett befreit, wurden zweimal durch eine Kotelettenmaschine gelassen und in 10 Liter bis zum Sieden erwärmtes Wasser gebracht. Vom Schlachten des Tieres bis zum Hineinbringen der zerkleinerten Muskelmasse ins kochende Wasser waren 1¾ Stunden vergangen; das ins Laboratorium gebrachte Muskelfleisch war noch warm, zuckte mit dem Messer geschlagen und ließ durchaus noch keine Erstarrungszeichen wahrnehmen. Die erste Extraktion mit der angegebenen Menge destillierten Wassers wurde unter Erwärmung bis zu 70 bis 85° C vollzogen und dauerte 30 Minuten; der Auszug wurde unter Benutzung einer Handpresse sorgfältig abgepreßt. Der Rückstand wurde sofort mit 6 Litern Wasser unter denselben Bedingungen weiter extrahiert und ebenfalls scharf abgepreßt[1]). Die erhaltenen ersten zwei Auszüge wurden zusammen eingeengt, die schwach alkalisch reagierende Flüssigkeit wurde bis 90° C erwärmt und mit Essigsäure bis zum Erscheinen eines flockigen Niederschlags, was bei einer deutlich sauren Reaktion auf Lackmus erfolgte, versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und das eingeengte Filtrat genau bis zu 1 Liter aufgefüllt. Dasselbe enthielt 13,43 g Stickstoff.

Die Flüssigkeit wurde mit 20proz. Bleiacetat unter Vermeidung eines Überschusses ausgefällt, der ziemlich große Niederschlag abgesaugt und sorgfältig gewaschen, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, bis zu etwa 1 Liter eingeengt, mit Schwefelsäure bis zu etwa 5 Proz. angesäuert und mit konzentrierter Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines Überschusses ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt, sorgfältig mit 3proz. Schwefelsäure, welche etwa 1 Proz. Phosphorwolframsäure enthielt, gewaschen und mit kristallinischem Bariumhydroxyd auf die übliche Weise zerrieben. Das Filtrat wurde mittels Schwefelsäure und Kohlensäure vom Baryt befreit, abermals filtriert, eingeengt und bis 500 ccm genau aufgefüllt. Dasselbe enthielt 7,3 g Stickstoff.

Die zuerst mit Salpetersäure (spezifisches Gewicht 1,4) bis zur amphoteren Reaktion versetzte Flüssigkeit wurde nachher mit 20proz. Silbernitratlösung ausgefällt und im Eisschrank über Nacht stehengelassen. Der ziemlich bedeutende Niederschlag der Purinbasen wurde abgesaugt und ein wenig gewaschen, zum Filtrat aber wurde noch mehr Silbernitratlösung, nämlich bis zum bekannten *Kossel*schen Punkt hinzugefügt. Das Glas wurde in Eis gestellt und die Flüssigkeit mit warmgesättigtem Barytwasser

---

[1]) An demselben Tage wurde auf die angegebene Weise noch ein dritter Auszug erhalten. Eingeengt, gelatinierte derselbe beim Erkalten und enthielt nur 0,55 g Stickstoff (im Verhältnis zu der in den ersten zwei Auszügen enthaltenen Stickstoffmenge nur etwa 3,78 Proz.). Dieser letzte Auszug wurde weiter nicht bearbeitet.

ausgefällt, so daß nach Beendigung dieser Manipulation die auszufällende Flüssigkeit höchstens die Zimmertemperatur erreicht haben konnte. Der bedeutende Niederschlag wurde abgesaugt und bis zum Verschwinden des Baryts im Waschwasser gewaschen, sorgfältig mit Sand zerrieben, mit ein paar Tropfen 50proz. Schwefelsäure versetzt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt; nach dem Abfiltrieren wurde die Bearbeitung des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff nochmals wiederholt.

Die erhaltene stark alkalische Flüssigkeit[1]) wurde eingeengt, bis 500 ccm genau aufgefüllt und darin der Stickstoff nach *Kjeldahl* sowie der Carnosingehalt nach der in *v. Fürths* Laboratorium ausgearbeiteten kolorimetrischen Methode bestimmt. Es wurden 2,6 g Stickstoff und 9 g Carnosin gefunden, in welch letzteren 2,23 g Stickstoff, d. h. 85,8 Proz. der gesamten Stickstoffmenge der Fraktion enthalten sein mußten. Endlich wurde die Flüssigkeit mit Salzsäure neutralisiert und zwecks Einverleibung eingeengt.

Genau auf dieselbe soeben beschriebene Weise wurde die Carnosinfraktion auch aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt dargestellt. Zur Verarbeitung gelangte eine direkt vom „Generaldepot der *Liebigprodukte*" (in Antwerpen) bezogene, etwa 225 g wiegende Portion des Extraktes, welche 22,4 g Stickstoff enthielt. Die Verteilung dieses Stickstoffs in den einzelnen Fraktionen wies jedoch einen wesentlichen Unterschied im Vergleich mit der Stickstoffverteilung in dem Extrakt aus frischem Fleisch auf, wie aus Tabelle I zu ersehen ist.

Tabelle I.

	Verteilung des Stickstoffs	
	im Extrakt aus frischem Fleisch	im *Liebig*schen Fleischextrakt
Gesamtstickstoff der Extrakte	14,43 g	22,40 g
Stickstoffgehalt in den PWS-Niederschl.	7,30 g	11,43 g
Dasselbe in Proz. des Gesamtstickstoffs	50,59	51,03
Stickstoffgehalt der Carnosinfraktionen	2,60 g	1,94 g
Dasselbe in Proz. des Gesamtstickstoffs	17,61	8,66
Carnosingehalt in den Carnosinfraktionen	9,00 g	3,50 g
Stickstoff des Carnosins	2,23 g	0,87 g
Dasselbe in Proz. des Gesamtstickstoffs	15,45	3,87
Dasselbe in Proz. des Stickstoffs der Carnosinfraktionen	85,77	44,70

Während also durch die Phosphorwolframsäure aus den beiden Extrakten ungefähr die gleiche Menge Stickstoff (etwa 50 Proz. des Gesamtstickstoffs) niedergeschlagen worden war, erwies sich die aus frischem Fleisch erhaltene Carnosinfraktion viel reicher an Stickstoff, als dieselbe Fraktion aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt (17,61 Proz. und 8,66 Proz. des Gesamtstickstoffs der Extrakte). Es ist dazu noch

[1]) Die so erhaltene flüssige Carnosinfraktion war nur schwach gelb gefärbt, zum Unterschiede von der auf ebensolche Weise dargestellten Fraktion aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt, welche bei ungefähr derselben Flüssigkeitsmenge eine unvergleichlich intensivere Färbung besaß, jedoch weniger Stickstoff enthielt.

sehr auffallend, daß die Carnosinfraktion aus frischem Fleisch sich als viel „reiner“ erwies in dem Sinne, daß sie mit 85,77 Proz. aus Imidazolkörpern, auf Carnosin berechnet, bestand, während dieselbe Fraktion aus dem *Liebig*schen Extrakt nur 44,7 Proz. Imidazolkörper enthielt; mit anderen Worten, es war die Menge der „Verunreinigungen“ bzw. andersartiger Substanzen in der Carnosinfraktion aus frischem Fleisch 55,3 : 14,3 = 3,86mal kleiner als in der gleichen Fraktion des *Liebig*schen Fleischextraktes.

Tierversuche mit den Carnosinfraktionen.

Die dargestellten Carnosinfraktionen wurden zwei Hunden von je etwa 9 kg Körpergewicht, welchen viele Monate vorher Magen- und Oesophagusfisteln angelegt worden waren, einverleibt, und nur einmal ist ein dritter, auf ebensolche Weise operierter, aber nur etwa 7 kg wiegender Hund benutzt worden. Alle Versuche wurden in der Art ausgeführt, daß die Lösungen in die V. jug. ext. injiziert wurden, während die Tiere sich schon im Gestell befanden. Die Prozedur der Injektionen war für dieselben vollständig harmlos, weil sie daran bereits gewöhnt waren. Die Resultate der Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt.

Auf Grund der angeführten Versuche halten wir uns für berechtigt, in bezug auf die excitosekretorischen Fähigkeiten der von uns angewandten Carnosinfraktionen folgendes auszusprechen.

Qualitativ ist die Einwirkung der Carnosinfraktion auf die Magendrüsen des Hundes die gleiche, ob dieselbe aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt oder aus ganz frischem Muskelfleisch stammt. Schon wenige Sekunden nach der Injektion trat eine Beschleunigung des Pulses ein (von 90—110 bis 180—250), unter Verminderung seiner Spannung; etwa 5 bis 20 Minuten nach der Einverleibung gewann der Puls jedoch seinen gewöhnlichen Charakter wieder. Zuweilen wurden auch kurz andauernde Dyspnoe und Erbrechensbewegungen bemerkbar. Etwa 1 bis 2 Minuten nach der Injektion beginnt als die erste die Speichelabsonderung. Nach einer in den meisten Fällen etwa 5 Minuten währenden latenten Periode zeigte sich dann der erste Tropfen eines sauren Magensaftes, dessen Absonderung je nach der Größe der einverleibten Dosis von 1½ bis 3 Stunden dauert. In einigen zeitlich voneinander nicht weit abgegrenzten Versuchen läßt sich eine geradezu vollständige Übereinstimmung der Resultate in bezug auf den Verlauf der Magensekretion, sowie auf die Eigenschaften des Sekrets konstatieren (vgl. Versuche 5 und 6). Im allgemeinen aber ist das resultierende Wirkungsbild sogar bei ein und denselben verabgabten Dosen, obwohl qualitativ stets das gleiche, in quantitativer Hinsicht jedoch in den verschiedenen Versuchen sehr oft stark verschieden.

Besonders auffallend ist aber die aus unseren Versuchen hervorgehende Tatsache, nämlich daß *die aus frischem Fleisch erhaltene Carnosin-*

Nr. des Versuchs	Hund	Körpergewicht	Datum	Einverleibte Carnosinfraktion					Menge des ausges[…] halbstün[…]		
					enthält		entspricht		vor der Injektion		
				Lösungsmenge	Stickstoff	Imidazolkörper	d. angegebenen Meng. *Liebigs* Fleischextr.	d. angegebenen Mengen fr. Fleisches	2	1	Reakt. d. Magenschleimhaut unmittelbar vor der Injektion
		kg	1925	ccm	g	g	g	g			
1	1	9	6. X.	16	1,1664	0,576	—	224	2,5	2,0	alk.
2	1	9	8. X.	8	0,0832	0,288	—	112	1,0	1,0	„
3	1	9	26. X.	11	0,1716	0,594	—	231	1,5	1,0	neutr.
4	1	9	27. X.	12	0,1872	0,648	—	252	—	1,0	alk.
5	1	9	13. XI.	10	0,1880	0,350	22,5	—	1,0	1,0	„
6	1	9	17. XI.	10	0,1880	0,350	22,5	—	—	1,0	„
7	1	9	1. XII.	12	0,2256	0,420	27,0	—	3,0	2,0	neutr.
8	2	9	8. X.	10	0,1040	0,360	—	140	0,5	0,5	alk.
9	2	9	20. XI.	20	0,3120	1,080	—	420	1,0	1,0	„
10	2	9	26. X.	10	0,1880	0,350	22,5	—	—	1,0	„
11	2	9	13. XI.	7,5	0,1410	0,264	16,9	—	0	0	„
12	2	9	17. XI.	10	0,1880	0,350	22,5	—	—	1,0	„
13	2	9	10. XI.	10	0,1880	0,350	22,5	—	—	2,0	„
14	3	7	17. XI.	10	0,1880	0,350	22,5	—	—	1,0	„

Abkürzungen in der Tabelle II.: alk. = alkalisch, b. = bis, Dsp. = Dy[…] beschleunigung, Spfl. = Speichelfluß, v. = von, w. = weiterer, wh = währ[…]

fraktion eine verhältnismäßig viel stärkere excitosekretorische Wirkung auf die Magendrüsen ausübt, als die auf genau dieselbe Art aus dem Liebigschen Fleischextrakt gewonnene. Rechnet man die nach der Injektion der Carnosinfraktion erhaltene Menge des Magensaftes auf 1 g des eingeführten Stickstoffs um, so erweist es sich nämlich, wie unten aus Tabelle III zu ersehen ist, daß die Aktivität der Carnosin-

Tabelle III.

Versuche	Hund	Ausgangsmaterial z. Darstellung der Carnosinfraktion	Gesamtmenge des einverl. Stickstoffs g	Gesamtmenge der einverl. Imidazolkörper g	Gesamtmenge des ausgesch. Magensaftes ccm	Magensekretion, umgerechnet auf 1 g einverl. Stickstoffs ccm	Imidazolkörper ccm
1 bis 4	1	Frisches Fleisch	0,6084	2,106	280	460	133
8 u. 9	2	Frisches Fleisch	0,416	1,44	58	139,4	40,3
5, 6 u. 7	1	*Liebigs* Fleischextr.	0,6016	1,12	165	274,3	147,3
10, 12 u. 13	2	*Liebigs* Fleischextr.	0,564	1,05	28,5	50,5	27,14

während				Dauer der latenten Periode	Sekretionsdauer	Gesamtmenge des ausgeschiedenen Magensaftes	Gesamtacidität	Freie Salzsäure	Nebenerscheinungen
	5	6	7	Min.	Min.	ccm	ccm	n/10 Lös.	
[illegible]	7,0	2,0	0	5	170	122,0	107	97	Erbr., Spfl., Pbschl. b. 150 wh. 2' 110 wh. w. 10' n. Inj.
[illegible]	0	—	—	12	105	23,0	58	39	Pbschl.
[illegible]	1,0	0	—	5	72	50,0	94	70	Dsp., Spfl., Pbschl. b. 240 wh. Inj., 120 wh. 5' n. Inj.
2,0	—	—	—	5	120	85,0	98	76	Spfl., Pbschl. b. 250 wh. 5', 120 wh. w. 5' n. Inj.
1,5	0,5	0	—	5	150	62,0	106	89	Spfl., Pbschl. b. 240 wh. Inj., 180 —140 wh. 20' n. Inj.
5,0	0	—	—	5	130	62,0	104	90	Spfl., Pbschl. v. 110 b. 240 wh. Inj., 130 wh. 20' n. Inj.
2,0	0	—	—	5	120	41,0	98	84	Spfl., Pbschl.
1,0	0	—	—	2	118	20,0	87	74	Spfl., Pbschl. v. 80 b. 180 wh. 2', 140 wh. w. 5' n. Inj.
8,0	0	—	—	5	120	38,0	68	36	Spfl., Pbschl. v. 110 b. 180 wh. Inj., 130 wh. 5' n. Inj.
0	—	—	—	5	90	6,5	41	0	Spfl., Pbschl. v. 90 b. 170 wh. Inj.
—	—	—	—	—	—	0	0	0	Keine
0	—	—	—	5	90	10,0	20	0	Spfl., Pbschl. v. 90 b. 190 wh. 2', 150 wh. w. 3' n. Inj.
0	—	—	—	5	90	12,0	82	70	Spfl., Pbschl. v. 110 b. 240 wh. 5', 150—120 wh. w. 5' n. Inj.
0	—	—	—	5	85	19,0	82	54	Spfl., Pbschl. v. 90 b. 180—150 wh. 5' n. Inj.

Erbrechen, Inj. = Injektion, n. = nach, neutr. = neutral, Pbschl. = Puls-

fraktion aus frischem Fleisch für den Hund 1 durch die Zahl 460 und für den Hund 2 durch die Zahl 139 ausgedrückt wird, während für dieselbe Fraktion aus dem *Liebig*schen Extrakt die entsprechenden Zahlen nur 274 und 50 sind. Es hat sich somit erwiesen, daß die Aktivität der Carnosinfraktion aus frischem Fleisch in den Versuchen mit dem ersten Hunde 1,7 und in den Versuchen mit dem zweiten Hunde sogar 2,8mal größer ist als die Aktivität derselben Fraktion aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt.

Es ergibt sich aus unseren Versuchen unter anderem also die sehr wichtige Schlußfolgerung, daß nämlich in bezug auf seine physiologische Wirksamkeit der käufliche *Liebig*sche Extrakt dem aus ganz frischem Muskelfleisch dargestellten durchaus nicht gleichzustellen ist, und daß zu dem Versuche, den etwaigen Einfluß auf die Tätigkeit der Verdauungsdrüsen zu ermitteln, sowie zur Prüfung der physiologischen Aktivität überhaupt, womöglich *nur frisch dargestellte Muskelextrakte* Verwendung finden sollten. Wie schon oben erwähnt, ist aber bis jetzt die Mehrzahl dieser Versuche gerade mit dem *Liebig*schen Extrakt

ausgeführt worden, welcher Umstand, unserer Meinung nach, auch als einer der Gründe in Betracht gezogen werden müßte, weshalb die Resultate zuweilen nur sehr schwach positiv und nicht selten sogar vollständig negativ ausgefallen sind.

Wenn man sich dessen erinnert, daß vom Gesamtstickstoff der Carnosinfraktion auf die Imidazolbasen in unserem Extrakt aus frischem Fleisch 85,77 Proz., im *Liebig*schen Extrakt dagegen nur 44,70 Proz. fallen (Tabelle I), so liegt die Vermutung nahe, daß die größere Aktivität der Carnosinfraktion aus frischem Fleisch in erster Linie wohl durch deren höheren Gehalt an diesen Basen zu erklären wäre. Rechnet man die in den entsprechenden Versuchen erhaltenen Mengen des Magensekrets auf die Einheit der mit den Carnosinfraktionen einverleibten Imidazolbasen um, so sieht man tatsächlich, daß die excitosekretorische Wirkung dieser Fraktionen in den Versuchen mit dem Hunde 1 praktisch vollständig die gleiche ist (133 und 147) (Tabelle III), in den Versuchen mit dem Hunde 2 aber ist der Unterschied, wenn man die Bedingungen eines Tierexperiments in Betracht zieht, so unbedeutend, daß die Wirkung ebenfalls als ungefähr die gleiche angesehen werden kann (40 und 27).

Zum Schluß möchten wir noch darauf hinweisen, daß schon solche Gaben der Carnosinfraktion, welche nur 200 bis 400 g frischen Fleisches, d. h. weniger als einer gewöhnlichen Hundemahlzeit entsprechen und nur (200 bis 400) . 100 : 3000 = 7 bis 13 Proz. vom Gewicht des Muskelgewebes des Versuchstieres (bei 9 kg Körpergewicht und 3 kg Muskelgewebe) ausmachen, sich als in hohem Grade aktiv erwiesen haben. Interessanterweise hat sich schon sogar eine Gabe, welche nur 112 g feuchten Muskelgewebes entspricht oder 112 . 100 : 3000 = 3,7 Proz. vom Gewicht des Muskelgewebes des Versuchstieres ausmacht, als fähig erwiesen, eine bedeutende Sekretion des Magensaftes hervorzurufen (23 ccm, Gesamtacidität = 58).

Über die Veränderung der Blutbeschaffenheit schwerer Diabetiker nach länger dauernder Insulineinwirkung.

Von

O. Klein.

(Aus der deutschen medizinischen Universitätsklinik in Prag.)

(Eingegangen am 19. Februar 1926.)

In früheren Untersuchungen[1]), welche das Verhalten des Wasser- und Salzwechsels, insbesondere die Änderungen des intermediären Wasser- und Salzwechsels bei Diabetikern unter der Einwirkung von Insulin zum Gegenstand hatten, wurde das eigenartige Verhalten des Blutwasser- und Blutkochsalzgehalts beschrieben, welches nach länger dauernder Insulinbehandlung namentlich bei schweren Fällen beobachtet werden kann.

Die Ergebnisse jener Studien waren kurz folgende: Nach den ersten Insulininjektionen beobachtet man bei schweren Fällen 3 bis 4 Stunden post injectionem einen Salz- und Wasserverlust des Blutes, d. h. also eine Zunahme der Blutkonzentration. Dauert bei schweren, namentlich bei acidotischen Fällen die Insulinbehandlung einige Tage lang an, so kommt es zu einem starken Ansinken der Blutkonzentration und einer deutlichen Zunahme des Blutkochsalzgehalts gegenüber der Zeit vor der Insulinbehandlung. Diese unter Insulinbildung auftretende Wasser- und Salzanreicherung des Blutes zeigt sich am deutlichsten in den Nüchternwerten bzw. in den mittleren Tageswerten, also, wenn der Kranke ohne exogene alimentäre Beeinflussung ist und auch keine kurz vorher erfolgte Insulininjektion die Blutzusammensetzung unmittelbar beeinflußt. In den genannten Untersuchungen bildete den Maßstab für die Beurteilung des Blutwassergehalts die Trockensubstanz des Gesamtblutes, der Serumeiweißgehalt und die Erythrocytenzahl, welche alle drei in jedem Falle stets bestimmt wurden. Alle drei Blutbestandteile zeigten Änderungen in gleichem Sinne; so sank die Erythrocytenzahl (= E. Z.) in einem Falle von 6200000 auf 3900000, die Trockensubstanz (= T. S.) von 24 Proz., in einem anderen Falle von 28 auf 16 Proz. und tiefer, der Serumeiweißgehalt von 10 auf 5,8 Proz. Diese Änderung der Blutbeschaffenheit tritt dabei schon nach einer Insulinbehandlung von sehr wenigen Tagen ein und besteht, wie aus den Zahlen zu ersehen ist, in einer enormen Blutverwässerung[2]).

---

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. **100**, 458, 1924; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **43**, 665 u. **47**, 309, 1924/25; hier auch Literatur.

[2]) Später haben *Widal* und Mitarbeiter (Presse médicale 1924) die gleichen Befunde erhoben.

Bei allen solchen Fällen, bei denen innerhalb kurzer Zeit eine so bedeutende Zunahme des Wassergehalts im Blute erfolgte, zeigte ein rapider Körpergewichtsanstieg (z. B. 12 kg in 7 Tagen), daß auch die übrigen Körpergewebe eine rapide Wasserzunahme erfahren haben. Die Körpergewichtszunahme und der Grad der Wasseranreicherung des Blutes gehen annähernd der Höhe der Insulindosis parallel. Die nachfolgenden Beobachtungen bilden eine Ergänzung jener früheren Studien.

Es wurde in einer größeren Anzahl von schweren Diabetesfällen die Änderung der Blutbeschaffenheit unter Insulinwirkung beobachtet. Es handelte sich vor allem um die Untersuchung des Nüchternblutes. Außer Blutzucker und wie bereits früher Erythrocytenzahl, Serumeiweißgehalt, Trockensubstanz und Blutkochsalzgehalt wurden noch andere Eigenschaften des Blutes, und zwar die Molekularkonzentration des Serums bzw. die Konzentration der gesamten gelösten Teile (Moleküle + Ionen), Bestimmung durch Gefrierpunktserniedrigung ($= \Delta$), die Oberflächenspannung des Serums und die Serumviskosität ($= \eta$) bestimmt. Die Untersuchungen bezogen sich überwiegend auf schwere Diabetesfälle, einige mittelschwere und leichte, ferner auch auf einige Nichtdiabetiker, bei denen auf Grund des bestehenden Leidens die Durchführung einer Insulinmastkur indiziert erschien.

In der tabellarischen Zusammenstellung findet sich nur ein Teil der Untersuchungsergebnisse (12 Fälle) mitgeteilt. Davon betreffen zehn Fälle Diabetiker, und zwar sieben schwere Fälle, drei mittelschwere bzw. leichte Fälle; bei den zwei Nichtdiabetikern handelt es sich um Fälle von leichter Lungentuberkulose, bei welchen eine Insulinmastkur durchgeführt wurde.

Methodisches.

Die Blutzuckerbestimmung wurde nach *Bang* durchgeführt (drei Kontrollbestimmungen), die Blutkochsalzbestimmung gleichfalls nach *Bang*[1]); bei Bestimmung der E. Z. wurden Doppelzählungen vorgenommen (*Thoma-Zeiss*sche Kammer), die T. S.-Bestimmung erfolgte nach *Bang* (drei Kontrollbestimmungen). Die Viskosität wurde mit dem *Determann*schen Viskosimeter bestimmt (mindestens zwei Kontrollbestimmungen). In einzelnen Fällen wurde neben der Viskosität des Serums auch die Viskosität des Gesamtblutes und Plasmas bestimmt. Zur Verhinderung der Gerinnung (bei Bestimmung der Plasmaviskosität) wurde Novirudin verwendet. In den Tabellen findet sich nur die Serumviskosität angeführt, da dieselbe stets in der ganzen Serie vorgenommen wurde. Der Serumeiweißgehalt wurde refraktometrisch (Eintauchrefraktometer von *Pulfrich*) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte sowohl im Kapillarblut als auch im Venenblut, angeführt finden sich nur die Werte des Kapillarblutes. Die Oberflächenspannung des Serums wurde durch Ermittlung der Tropfenzahl mit Hilfe des Stalagmometers von *Traube* bestimmt[2]). Die Zahlen in den Tabellen beziehen sich auf die Tropfenzahl des Wassers; dieselbe wurde mit 100 Normal-

[1]) Kontrollbestimmungen!
[2]) Also die „dynamische" Oberflächenspannung!

tropfen angenommen. Die auf Wasser bezogene Tropfenzahl des betreffenden Serums Z wurde nach der Formel $Z = Z_n/Z_w$ (Z_n = die ermittelte absolute Tropfenzahl des Serums, Z_w = die Tropfenzahl des Wassers in dem betreffenden Stalagmometer). Die Gefrierpunktserniedrigung des Serums (= Δ) wurde mit Hilfe des *Beckmann*schen Apparats (mindestens zwei Kontrollbestimmungen) ermittelt. Das Blut wurde mit Ausnahme eines Falles, bei welchem zwei Blutuntersuchungen an einem Tage vorgenommen wurden (Fall 2), stets nüchtern aus der Fingerbeere, zur Kryoskopie und Stalagmometrie aus der Vene durch Venaepunction entnommen. Bei allen Fällen wurde das Blut ein oder mehrere Male vor der Insulinbehandlung, ferner in bestimmten Zeitabständen während der Insulinbehandlung mehrere Male untersucht. Das Körpergewicht wurde immer zur selben Tageszeit, morgens im Nüchternzustand bestimmt. Dieses sowie die Insulindosis findet sich in den Tabellen vermerkt. Die Diät bestand bei den meisten Fällen je nach Körpergewicht in 50 bis 70 g Eiweiß, 40 bis 60 g Kohlehydraten, 150 bis 180 g Fett. Der Kochsalzgehalt war ein mittlerer, 10 bis 15 g. In zwei Fällen wurde mit Absicht, um den Einfluß dieser Maßnahme auf die Blutbeschaffenheit zu studieren, der Kochsalzgehalt der Kost vorübergehend stark (auf 2 bis 4 g NaCl) reduziert, hernach wurden wieder einige Tage mit sehr kochsalzreicher Diät, 20 g NaCl, eingeschoben. Ein Fall erhielt durch längere Zeit hindurch überwiegend Kohlehydratkost (Mehlfrüchtetage). Die entsprechenden Daten sind in den Tabellen vermerkt.

Wie die Zahlen in den Tabellen zeigen, bilden die hier mitgeteilten Untersuchungsergebnisse, soweit es sich um schwere Diabetiker handelt, eine Bestätigung der früher mitgeteilten, oben angeführten Befunde. Im einzelnen verhielten sich die verschiedenen Blutbestandteile unter Insulinbehandlung folgendermaßen:

Die *Erythrocytenzahl* und die *Trockensubstanz (Nüchternwerte) sinken* in fast allen schweren Fällen (Fall 1, 2, 3, 5, 7, 10) *während der Insulinbehandlung gegenüber der Zeit vor der Insulineinwirkung ganz bedeutend ab*[1]). Am deutlichsten findet sich diese Erscheinung bei den schweren Fällen (1 und 7), die im präkomatösen Zustand eingeliefert wurden und in Behandlung kamen. *Der Serumeiweißgehalt* zeigte in allen diesen Fällen unter der Insulineinwirkung *gleichfalls eine Abnahme*, doch ist in quantitativer Hinsicht der Ausschlag weniger deutlich. Bei den mittelschweren und leichten Fällen findet sich in bezug auf die Änderungen der E. Z., der T. S. und des Serumeiweißgehalts ein ähnliches Verhalten, doch sind die Änderungen nicht so regelmäßig, und die einzelnen Blutbestandteile ändern sich nicht immer in gleichem Sinne. Das nämliche gilt auch für die Nichtdiabetiker, die mit Insulin behandelt wurden. So sinkt bei Fall 4 in den ersten Tagen der Insulinbehandlung die E. Z., während die T. S. sich kaum ändert, der Serumeiweißgehalt sogar ansteigt. Es bildet in diesem Falle die Höhe der T. S. sozusagen einen Interferenzwert zwischen den beiden anderen Blutbestandteilen (E. Z. und Serumeiweißgehalt). Bei Fall 8 sinken allerdings alle drei Blutbestandteile in gleichem Sinne, wie bei den schwereren Fällen. Bei Fall 6, einem leichten Diabetiker, zeigen E. Z.,

[1]) Das Absinken der Nüchternwerte der Blutkonzentration nach länger dauernder Insulineinwirkung ist das viel deutlichere und augenfälligere Phaenokular als der kurz dauernde Anstieg derselben unmittelbar nach der Insulininjektion. Typische Beobachtungen siehe in den früheren Arbeiten: Zeitschr. f. kl. Med. **100**, 467; Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **48**, 691.

der Serumeiweißgehalt und T. S. in den ersten Tagen der Behandlung sogar einen Anstieg. Das hängt wohl zum Teil damit zusammen, daß dieser leichte Fall in der Zeit vor der Insulinbehandlung, als die erste Blutentnahme erfolgte, unter Kohlehydrat und eiweißarmer Diät (Gemüsetage) stand, in welcher Diätperiode, wie bereits früher gezeigt werden konnte, der Nüchternwert der Blutkonzentration bei Diabetikern relativ niedriger ist, im Gegensatz zu Perioden von kohlehydrat- und eiweißreicher Kost[1]). Die zuerst von *Jaksch* beobachtete Bluteindickung bei schweren Diabetesfällen findet sich also nur in Perioden gemischter Kost [*O. Klein*[1])]. Bei Nichtdiabetikern (Fall 11 und 12) auch bei den hier nicht mitgeteilten Fällen — zeigen die genannten Blutbestandteile unter Insulinbehandlung gleichfalls meist eine Tendenz zur Abnahme, jedoch bewegen sich die einzelnen Blutbestandteile keineswegs immer gleichsinnig, und ihr diesbezügliches Verhalten zeigt nicht die Gesetzmäßigkeit, wie bei schweren mit Insulin behandelten Diabetesfällen.

Die Nüchternwerte des Blutkochsalzgehalts zeigen unter Insulinbehandlung bei schweren Fällen *gegenüber der Zeit vor der Behandlung einen deutlichen Anstieg.* Dieses Verhalten konnten wir fast ausnahmslos bei allen schweren mit Insulin behandelten Fällen beobachten, auch in den hier angeführten schweren Fällen (Fall 1, 2, 3, 5, 7, 10) zeigt der Blutkochsalzwert diesen Anstieg. Auf das Verhalten des zweiten Wertes bei Fall 2, der im Blute 4 Stunden nach der ersten Injektion am 17. Dezember gefunden wurde, wird noch später eingegangen werden. Es handelt sich hier um die erste Phase der Insulinwirkung. Bei den leichteren Fällen und bei den Nichtdiabetikern ist auch die Bewegung des Blutkochsalzspiegels (ähnlich wie das Verhalten der T. S., E. Z. usw.) nicht einheitlich und das Verhalten kein gesetzmäßiges.

Bei Fall 2 wurde das Blut am Tage der ersten Insulininjektion zweimal, das erste Mal nüchtern und das zweite Mal 4 Stunden nach der Insulininjektion — also auf der Höhe der Insulinwirkung — untersucht. Der Blutzucker (= B. Z.) fiel von 0,307 auf 0,08 Proz. ab, die *Blutkonzentration zeigt eine Zunahme,* die sowohl in einem *Anstieg der E. Z., des Serumeiweißgehalts,* als auch *der T. S.* — besonders der beiden letzteren Werte — ihren Ausdruck fand. Gleichzeitig mit der Wasserabnahme des Blutes erfolgte auch eine *Abnahme des Blutkochsalz*gehalts (*Abstrom von H_2O und NaCl aus der Blutbahn nach der ersten Insulininjektion*). Der *Anstieg des Gefrierpunkts des Serums* um drei Zehntelgrade deutet auf eine *Abnahme der gesamten Molekularkonzentration* (Moleküle + Ionen) hin: Vielleicht erfolgt außer dem Austritt von Kochsalz auch ein Austritt anderer osmotisch aktiver Blutbestandteile (Elektrolyte!) aus dem Blute. Es soll hier nur auf die von *Harrop* und *Benedikt, Briggs, Doisy* und *Weber, Staub*[2]) u. a. gefundene Abnahme des anorganischen Phosphors und des Kaliums unter Einwirkung von Insulin hingewiesen werden. Schließlich mag auch das starke Absinken des B. Z. zum Teil als Ursache für das Kleinerwerden von Δ eine Rolle spielen.

Es sei hier noch das Verhalten des schweren Falles *K.* (Fall 3) und des mittelschweren Falles *V.* (Fall 4) des näheren besprochen. Bei diesen Kranken wurde, nachdem sie bereits unter länger dauernder Insulinbehandlung standen, das Diätregime in dem Sinne geändert, daß nach einer

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 48, 665.

[2]) Ausführliche Literaturangabe siehe bei *Staub*, Insulin, 2. Aufl. Berlin, J. Springer, 1925.

Kostperiode mittleren Kochsalzgehalts ein plötzlicher Übergang zu kochsalzarmer Diät stattfand (betreffs der näheren Daten siehe Tabelle). Die Zahlen zeigen sehr deutlich, daß *bei dem schweren Fall*, bei dem in kurzer Zeit unter Insulinbehandlung ein rapider Körpergewichtsanstieg zu verzeichnen war, *ein wesentlicher Teil der Gewichtszunahme nach Entzug des Kochsalzes aus der Nahrung verloren geht*. Offenbar hatte es sich hier großenteils um retiniertes Wasser gehandelt. Geht man hernach wieder zu kochsalzreicher Kost über, so wird der Körpergewichtsverlust, wie aus der Tabelle deutlich ersichtlich ist, wieder eingebracht. Im Gegensatz dazu zeigt bei Fall *V.* (mittelschwer) der unter Insulinbehandlung auch weniger an Körpergewicht zugenommen hatte wie der eben genannte Fall, und bei welchem vor allem der Körpergewichtsanstieg viel allmählicher erfolgt war, das Körpergewicht kaum nennenswerte und die Blutkonzentration geringere Schwankungen beim Wechsel des Diätregimes als beim schweren Fall *K.* In beiden Fällen sind die Schwankungen beim Übergang von salzreicher zu salzarmer Diät und umgekehrt sehr charakteristisch. Beim Übergang von salzreicher zu salzarmer Kost kommt es besonders bei Fall 3 zu einem sprunghaften Anstieg der unter der Insulinbehandlung bereits stark abgesunkenen Blutkonzentration, also zu einem starken Wasserverlust des Blutes. Es zeigen hier fast gleichzeitig mit dem Absinken des Blutkochsalzspiegels und bei Fall *K.* gleichzeitig mit der Abnahme des Körpergewichts sowohl E. Z. als auch der Serumeiweißgehalt und die T. S. einen ganz beträchtlichen Anstieg, dabei ist der Ausschlag im Verhalten der E. Z. und T. S. deutlicher als der im Verhalten des Serumeiweißgehalts. Beim Übergang von salzarmer zu salzreicher Kost kommt es zu einer Wiederherstellung der früheren Verhältnisse: Das Blut nimmt an Wasser und Kochsalz zu, die T. S., E. Z. und der Serumeiweißgehalt sinken annähernd zu ihrem früheren Werte ab. Dieses Verhalten ist besonders bei Fall *K.*, dem schweren Diabetiker, sehr deutlich, weniger bei dem mittelschweren Fall *V.* Es verhält sich also der mit Insulin behandelte schwere Fall *K.* sowohl in bezug auf das Körpergewicht als auch in bezug auf die Blutkonzentration wie ein wasser- und salzreich ernährtes Individuum, ja fast wie ein Kranker im Stadium des latenten Ödems (Präödems). Die Gewebe und das Blut verfügen hier über relativ sehr viel leicht mobilisierbares Wasser und Kochsalz. Bei Reduktion der Kochsalzzufuhr in der Nahrung geht diese Reserve der Gewebe und des Blutes an Wasser und Salz (das zirkulierende Kochsalz und die Kochsalzplethora von *V. H. Veil*) zum Teil verloren. Es kommt durch den Verlust des durch die Kochsalzverarmung frei werdenden Wassers (Reduktionswasser von *Tobler*) zum Gewichtsverlust und zur Abnahme von Wasser und Salz im Blute. Der Umstand, daß *beim schweren mit Insulin behandelten Diabetiker* die Ausschläge viel größer, *die Wasser- und Salzanreicherung des Organismus bedeutender* ist, als beim mittelschweren mit Insulin behandelten Fall, weist darauf hin, daß *bei ersterem unter der Insulinwirkung viel mehr Wasser und Salz retiniert worden* ist als bei letzterem. Bei beiden Fällen nimmt trotz Absinken des Blutkochsalzgehalts die Molekularkonzentration (Summe der gelösten Teilchen: Moleküle + Ionen) des Serums beim Übergang von salzreicher zu salzarmer Diät zu, d. h. wird größer. Offenbar ist der Einfluß der sehr bedeutenden Wasserabnahme des Blutes auf die gesamte Molekularkonzentration, den osmotischen Druck des Blutserums größer als die Abnahme des Blutkochsalzgehalts.

Vom rein methodischen Gesichtspunkt — für das Studium des intermediären Wasserwechsels — scheint es von Interesse, daß hier auf die

Änderungen des Wasserbestandes des Blutes aus den Bewegungen der drei Blutbestandteile: E. Z., Serumeiweißgehalt und T. S. geschlossen wurde. Auch in den früheren Untersuchungen[1]), die das Verhalten des intermediären Wasserwechsels zum Gegenstand hatten, wurden diese drei Blutbestandteile bestimmt. Zu mindest aber das Verhalten zweier Blutbestandteile (z. B. Serumeiweißgehalt + E. Z.) berücksichtigt. Dort wie hier konnte festgestellt werden, daß bei größeren Schwankungen des Blutwassergehalts sowohl E. Z. als auch T. S. und Serumeiweißgehalt Bewegungen in gleicher Richtung zeigen. Den geringsten Ausschlag zeigen dabei die Schwankungen des Serumeiweißgehalts. Bei geringen quantitativen Änderungen im Blutwassergehalt kann der Serumeiweißgehalt, wenn z. B. T. S. und E. Z. sinken — worauf ja bereits *Nonnenbruch*, *Berger* u. a. hingewiesen haben —, unverändert bleiben, ja sogar etwas ansteigen, offenbar infolge Einschwemmung von Eiweiß mit dem aus dem Gewebe in die Blutbahn einströmenden Transsudat bei eintretender Blutverdünnung (Wasserzunahme des Blutes). Auf die hier bestehenden Zusammenhänge wurde bereits von früheren Untersuchern [*Nonnenbruch*, *Veil* u. a.[2])] genügend hingewiesen. Was speziell das diesbezügliche Verhalten der einzelnen Blutbestandteile beim intermediären Wasserwechsel *des Diabetikers* betrifft, so wurde dasselbe in früheren Untersuchungen eingehend erörtert. Es sei hier nur dahin verwiesen. In bezug auf die Streitfrage, ob es methodisch richtiger ist, aus den Bewegungen der E. Z. (bzw. des Hämoglobingehalts) oder denen des Serumeiweißgehalts auf Änderungen des Wassergehalts des Blutes zu schließen (*V. H. Veil*, *Nonnenbruch*) muß auf Grund früherer und vorliegender Untersuchungen ein mittlerer Standpunkt eingenommen werden. Denn alle größeren Schwankungen des Wassergehalts des Blutes spiegeln sich in gleichsinnigen quantitativen Veränderungen beider Blutbestandteile wieder. Bei geringeren Schwankungen des Wassergehalts werden die Bewegungen weniger einheitlich, es bleibt hier besonders der Serumeiweißgehalt selten zurück, zeigt gar keine Änderung oder eine solche in entgegengesetztem Sinne. Die Werte der T. S. bewegen sich meist in der Mitte zwischen denen der E. Z. und des Serumeiweißgehalts[3]).

Über das Verhalten der Gefrierpunktserniedrigung (Δ) beim Diabetes mellitus finden sich bereits in früheren Arbeiten reichlich Angaben (*v. Koranyi* u. a.). In letzter Zeit hat *Lippmann*[4]) diesbezügliche Beobachtungen veröffentlicht. Er fand in mehreren Fällen von Diabetes mel. den Gefrierpunkt des Serums herabgesetzt. Diese Zunahme der Molekularkonzentration des Diabetikerserums läßt sich, wie aus den Berechnungen dieses Autors mit Sicherheit hervorgeht, nicht allein auf die Erhöhung des B. Z. zurückführen. Da der Gehalt des Diabetikerserums an Elektrolyten kaum erhöht ist, ja vielleicht im Gegenteil, wie auch wir bei den meisten schweren Fällen

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. **100**; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **48**.

[2]) *W. H. Veil*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **23**, 648, 1923; *Nonnenbruch*, ebendaselbst **26**, 119, 1925.

[3]) Wir haben deshalb beim Studium des intermediären Wasserwechsels in den früheren Untersuchungen und auch hier stets mindestens das Verhalten zweier Werte, z. B. der E. Z. und der Serumrefraktion, und wenn es aus technischen Gründen möglich war, d. h. die Serie der Blutentnahme nicht zu dicht war, auch noch das Verhalten der T. S. des Gesamtblutes berücksichtigt.

[4]) Zentralbl. f. inn. Med., 41. Jahrg., S. 41, 1920.

finden konnten, der Kochsalzgehalt des Diabetikerblutes oft deutlich erniedrigt ist [Hypochlorämie des Diabetikerblutes (siehe die früheren Befunde von *E. Reis*, *V. H. Veil*, *Meyer-Bisch* u. a.)], so müssen für die Erhöhung der Gesamtmolekularkonzentration andere Stoffe außer Zucker und Elektrolyten verantwortlich gemacht werden. Mit Recht weist *Lippmann* diesbezüglich auf die Substanzen des Restkohlenstoffs (Ketonkörper, Fettsäuren u. a. zum Teil noch unbekannte Stoffe), die im Blute des Diabetikers von *Stepp*, *Gigon* stark vermehrt gefunden wurden, als für die Erhöhung der Molekularkonzentration in Betracht kommend, hin. Die eigenen Messungen ergaben, wie die vorliegenden Zahlen zeigen, bei einzelnen Fällen, aber keineswegs bei allen, pathologisch große Werte für Δ. Derart abnorm große Werte für Δ (Δ tiefer als —0,58) wurden bei Fall 2, 4, 7, 9 vor der Insulinbehandlung gefunden. Bei letzterem Falle, der nur einmal untersucht wurde (es handelt sich um ein Coma diabeticum), wurde bei bestehender Bluteindickung (hohe Werte der E. Z., des Serumeiweißgehalts) bei hohem B. Z. (über 0,5 Proz.) bei fehlender Erniedrigung des Blutkochsalzgehalts, niedriger Alkalireserve, hochgradiger Ketonurie für Δ der Wert von —0,68 gemessen. Auch bei Fall 7 bestand eine Bluteindickung (E. Z. und T. S. sehr hoch!) bei fast normalem Blutkochsalzgehalt. Der Fall war präkomatös, *Kussmaul*sche Atmung schon angedeutet; der Blutzucker war sehr hoch über 0,4 Proz., die Alkalireserve sehr niedrig. Δ wurde hier mit —0,625 gemessen. Mit Ausnahme von Fall 4, der mittelschwer war, betrafen die pathologisch erhöhten Werte von Δ stets unbehandelte schwere Fälle. Es wurde bereits in der genannten früheren Arbeit über das Verhalten von Δ bei mit Insulin behandelten schweren Diabetesfällen berichtet und Resultate von Messungen mitgeteilt[1]). Es stellte sich dabei heraus, daß die Gefrierpunktserniedrigung, die ja von der Konzentration der gesamten in Lösung befindlichen Teile (Moleküle + Ionen) abhängt, einen Interferenzwert darstellt, der die Resultierende der verschiedenen unter Insulineinwirkung im Blute einhergehenden Vorgänge wie Änderungen im quantitativen Verhalten der verschiedenen Elektrolyte, in molekulardisperser Lösung befindlichen Stoffe (Zucker, Harnstoff usw.), des Wassergehalts usw. darstellt. Es ist daher verständlich, daß Δ bei starken Schwankungen der Blutkonzentration (z. B. bei Eintreten starker Blutverdünnung unter Insulineinwirkung) nur geringe oder gar keine Änderungen zu zeigen braucht, wenn sich gewisse osmotisch im hohen Grade aktive Elektrolyte in entgegengesetzter Richtung wie die anderen Blutbestandteile bewegen. Es wurde in der früheren Mitteilung darauf hingewiesen und Beispiele dafür angeführt, daß Δ als Ausdruck der gesamten Molekularkonzentration unverändert bleiben kann oder eine nur geringe Änderung zeigt, wenn beispielsweise unter Insulineinwirkung bei Abnahme der Blutkonzentration, also Zunahme des Wassergehalts des Blutes der Blutkochsalzgehalt gleichzeitig ansteigt. H_2O und NaCl bewegen sich ja bei solchen Änderungen meist gleichsinnig; es wird dann die durch die Blutverdünnung bewirkte Abnahme der Konzentration der gelösten Teile durch die Zunahme des Kochsalzgehalts kompensiert, so daß der osmotische Druck des Serums annähernd unverändert bleibt. Das NaCl gibt ja diesbezüglich im Blute den größten Ausschlag, da es der quantitativ in größter Menge im Blute vorkommende Elektrolyt ist. Die Kolloide beeinflussen ja den osmotischen Druck in unverhältnismäßig geringerem Grade und auch die in molekulardisperser Lösung befindlichen Stoffe Zucker, Harnstoff stehen diesbezüglich

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 47, 320, 1925.

hinter dem Kochsalz zurück. Die anderen Elektrolyte Ca-, K-Salze usw. sind in viel geringerer Quantität im Serum enthalten als Na Cl. Der osmotische Druck bleibt also leicht unverändert, wenn bei eintretender Wasserzunahme des Blutes auch das Kochsalz zunimmt und sich so quantitativ entgegengesetzt verhält, wie die Kolloide und die übrigen Kristalloide. Beobachtungen, die als Beispiele für dieses Verhalten gelten müssen, wurden bereits früher mitgeteilt. Ähnliches zeigen auch die vorliegenden Beobachtungen. Im allgemeinen wird Δ im Blute der schweren Diabetiker unter Insulinbehandlung kleiner, gegenüber den Werten, die vor der Insulinbehandlung gefunden werden, doch ist das Kleinerwerden von Δ im Verhältnis zu der starken Abnahme der Blutkonzentration unbedeutend. So ändert sich Δ bei Fall 1 auf der Höhe der Insulineinwirkung bei stärkster Wasseranreicherung des Blutes nur um 2 bis 3 Zentigrade gegenüber dem Wert, der vor der Insulinbehandlung gefunden wurde, während die T. S. um 4½ Proz., die E. Z. um 2½ Millionen abgenommen haben. Bei Fall 7 ist das Verhältnis ähnlich: Der Gefrierpunkt steigt um 4 Zentigrade, während die Erythrocyten um 2½ Millionen, die T. S. um 7 Proz. abgenommen hat! Ein ähnliches Verhalten von Δ bzw. seine Änderung unter Insulinbehandlung findet sich auch bei anderen schweren Fällen.

Bei Fall 2, bei welchem, wie bereits erwähnt, am gleichen Tage einmal nüchtern, ein zweites Mal 4 Stunden nach der ersten Insulininjektion — also auf der Höhe der Insulinwirkung — eine vollständige Blutuntersuchung vorgenommen worden war, zeigte Δ eine Änderung um 3 Zentigrade, der Gefrierpunkt stieg von —0,59 auf —0,56, trotz eintretender Bluteindickung, welch letztere wir bei allen schweren Fällen nach der ersten Insulininjektion eintreten sahen. Diese Verringerung der Molekularkonzentration nach der ersten Insulininjektion — eine solche Beobachtung wurde bereits früher mitgeteilt — erklärt sich wohl zum Teil aus dem starken Absinken des B. Z., teilweise trug auch die allerdings geringe Abnahme des Blutkochsalzgehalts, vielleicht auch noch die anderer Elektrolyte (Salze der Phosphorsäure?) dazu bei, vielleicht auch eine Abnahme der Substanzen des Restkohlenstoffs. Die Bluteindickung, die wohl vor allem in einer Zunahme des prozentuellen Gehalts an Kolloiden besteht, wird hier durch die gleichzeitige Abnahme der genannten gelösten, zum Teil osmotisch wirksamen Stoffe[1]) überkompensiert.

Unter länger dauernder Insulinbehandlung kann dann, wie die Zahlen in den Tabellen zeigen, die Gefrierpunktserniedrigung wieder größer werden. Bei den mittelschweren Diabetikern und Nichtdiabetikern ist die Änderung von Δ unter dem Einfluß der Insulineinwirkung keine typische, doch tritt auch hier die Tendenz zum Anstieg des Gefrierpunktes gegenüber der Zeit vor der Insulinbehandlung hervor, so z. B. bei Fall 4 und bei Fall 8.

Im allgemeinen kann man also sagen, daß wir *bei schweren Diabetesfällen häufig eine stärkere Gefrierpunktserniedrigung beobachten* können: In vier Fällen wurden Werte von unter —0,6°, in einem Falle (Fall 9) wurde —0,68° gemessen. *Diese pathologischen Werte für Δ sind wohl bedingt durch die Bluteindickung.* Dort, wo eine Hypochlorämie besteht, führen offenbar die Wasserverarmung des Blutes einerseits, die *Anhäufung* anderer *zum Teil in molekulardisperser Lösung befindliche Stoffe*, wie *Blutzucker*, Harnstoff, *Abbauprodukte von Fett* und Eiweiß, die Blutfette, die *Substanzen des Rest-*

[1]) Von diesen findet sich ein Teil, wie die anorganischen Salze, zum größten Teil in Ionen gespalten, die anderen Substanzen zumindest in molekulardisperser Lösung im Blute.

kohlenstoffs, die um ein Vielfaches enorm erhöht gefunden werden, andererseits zu einer Zunahme der gesamten Molekularkonzentration (Konzentration von Molekülen + Ionen). *Unter Insulinbehandlung findet dann eine mäßiggradige Abnahme von Δ (Ansteigen des Gefrierpunkts* — der Nüchternwerte!) *statt.* Diese geringe Änderung von Δ wird bedingt durch *teilweise Abnahme jener beim schweren Diabetiker im Blute angehäuften Stoffe,* wie sie unter Insulinwirkung eintritt. Es kommt dabei weniger der B. Z. in Betracht, der auch bei mit Insulin behandelten Diabetesfällen im Nüchternzustand, wie ein Blick auf die Zahlen in der Tabelle zeigt, oft noch recht hoch ist, als vielmehr jene genannten Abbauprodukte der Fette, Kohlehydrate (Substanzen des Restkohlenstoffs, Fettsäuren, Ketonkörper u. a.), vielleicht auch Abbauprodukte des Eiweißes, die unter Insulinbehandlung im Blute stark abnehmen bzw. verschwinden. *Die mit der Blutverdünnung oft gleichzeitig eintretende Anreicherung des Blutes mit Kochsalz wirkt in bezug auf die Erhaltung der Gesamtmolekularkonzentration bzw. des osmotischen Druckes der Annahme jener genannten Substanzen entgegen, so daß die Änderung von Δ sich innerhalb mäßiger Grenzen hält.* Bei weiterer Insulinbehandlung sinkt der Gefrierpunkt des Serums häufig wieder etwas ab.

Die *Viskosität des Serums* und die *Oberflächenspannung* desselben bzw. deren reziproker Wert, die stalagmometrisch ermittelte Tropfenzahl zeigen bei schweren Diabetesfällen unter Insulineinwirkung ganz charakteristische Änderungen. Die *Viskosität* zeigt in fast allen Fällen *unter Insulinbehandlung eine Abnahme* gegenüber der Zeit vor der Behandlung, die *Oberflächenspannung* fast *ausnahmslos eine Zunahme (Abnahme der Tropfenzahl).* Da sowohl Viskosität als auch Oberflächenspannung mit den Eigenschaften der Kolloide: Dispersitätsgrad, Hydratation usw., in inniger Beziehung stehen und da solche Eigenschaften bei den Emulsionskolloiden weitgehend abhängig sind von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit ihres Milieus, wie vom H—OH-Ionengehalt, vom Gehalt des Lösungsmittels an Kationen und Anionen — im schwach alkalisch reagierenden Blute von den Kationen mehr als von den Anionen —, so liegt die Annahme nahe, daß die unter Insulinbehandlung eintretende Abnahme der Viskosität und die gleichzeitige Zunahme der Oberflächenspannung die gleiche Ursache haben, welche eben in einer unter der Insulineinwirkung vor sich gehenden Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Blutes zu suchen ist. Auch sonst bewegen sich ja Viskosität und Oberflächenspannung kolloidaler Lösungen in entgegengesetzter Richtung (siehe bei *Höber* und bei *Schade*[1]). Die Emulsionskolloide beeinflussen ja in weitgehendem Grade je nach ihrer „Kolloidität" (wie Hydratationsgrad usw.) die Viskosität und die Oberflächenspannung ihrer Lösungen. Die Zahlen in den Tabellen zeigen, daß die Viskosität des Serums bei den schweren unbehandelten Diabetesfällen relativ hoch ist, die Oberflächenspannung aber oft ganz bedeutend herabgesetzt ist. So finden wir stalagmometrische Werte, z. B. bei Fall 1 von 120, bei Fall 7 von 114! Als normal gelten für das Serum die Werte 109 bis 112 Normaltropfen (*Traube*). Bei Fall 1, 3, bei Fall 8 und 9 zeigt die Serumviskosität recht hohe Werte. Offenbar bewirken gewisse im Serum des unbehandelten Diabetikers angehäufte Stoffe durch ihren Einfluß auf den Kolloidzustand der Serumeiweißkörper gleichzeitig eine Herabsetzung der Oberflächenspannung und eine Erhöhung der Viskosität. Es kommen hier in Betracht eine Änderung

[1]) *R. Höber*, Physik. Chem. d. Zelle u. Gewebe 1922, S. 246; *H. Schade* Physik. Chem. in d. inn. Med. 1923, S. 198.

im Kationengehalt des Serums, eine Vermehrung oberflächenaktiver Substanzen, von Abbauprodukten der Fette und des Eiweißes; vielleicht sind diese Substanzen zum Teil identisch mit den Stoffen des Restkohlenstoffs. Es soll hier auch darauf hingewiesen werden, daß auch von anderer Seite, *H. Pribram* und Mitarbeitern, die Oberflächenspannung herabsetzende Stoffe (Eiweißabbauprodukte ?) im Harn und Serum schwerer Diabetiker nachgewiesen wurden. Eine Parallele zu Änderung der Alkalireserve besteht nur im allgemeinen, wie wir in zwei Fällen beobachten konnten[1]). Unter Insulinbehandlung verschwinden offenbar jene genannten, den Kolloidzustand der Serumeiweißkörper beeinflussenden Substanzen mehr oder weniger aus dem Blute oder werden auf ihre normale Menge reduziert, womit die Änderung von Oberflächenspannung und Viskosität herbeigeführt wird. Die oft sehr niedrige Viskosität des Serums, die relativ hohe Oberflächenspannung (geringe Tropfenzahl) desselben, wie sie bei unter länger dauernder Insulinbehandlung stehenden Diabetikern beobachtet wird, sind vielleicht zum Teil auf die starke Wasseranreicherung des Blutes zurückzuführen. So findet sich bei Fall 1 auf der Höhe der Insulinbehandlung bei starker Wasseranreicherung des Blutes (T. S. = 15,9 Proz.!) eine Viskosität von nur 1,43; einige Zeit vorher bei einer T. S. von etwa 16 Proz. eine Tropfenzahl von nur 106,5. Bei Fall 5 beträgt nach viertägiger Insulinbehandlung bei einem T. S.-Gehalt des Blutes von 18 Proz. die Tropfenzahl des Serums 106,8, die Serumviskosität nur 1,33.

Ähnlich niedrige Werte für die Viskosität und hohe Werte für die Oberflächenspannung im Zeitpunkt größter Wasseranreicherung des Blutserums wurden bei den anderen schweren mit Insulin behandelten Diabetesfällen beobachtet. Dauert die Insulinbehandlung länger an, so kann, wie die Zahlen in den Tabellen zeigen, die Viskosität wieder etwas zu, die Oberflächenspannung wieder etwas abnehmen; doch werden die Werte, die vor der Insulinbehandlung beobachtet wurden, nicht erreicht. Bei leichten Diabetesfällen und bei Nichtdiabetikern zeigen Viskosität und Oberflächenspannung des Serums unter Insulinbehandlung keine derartig charakteristische Änderung.

Wie aus den früheren und den vorliegenden Untersuchungen hervorgeht, läßt die unter Insulinwirkung eintretende Änderung der Blutbeschaffenheit *schwerer* Diabetesfälle ganz deutlich drei Phasen erkennen.

Die erste Phase, die die unmittelbare Wirkung der ersten Injektionen betrifft, ist charakterisiert durch den Eintritt einer Bluteindickung und durch Abnahme des Blutkochsalzgehalts, durch Abstrom von Wasser und Salz aus dem Blute ins Gewebe (Anstieg von Erythrocyten, Trockensubstanz und Serumeiweißgehalt). Es ist wahrscheinlich, daß auch später bei länger dauernder Insulinbehandlung unmittelbar nach jeder Insulininjektion diese Wirkung des Insulins auf den intermediären Wasser- und Salzwechsel eintritt [*Staub*[2])]. Doch ist diese erste Phase

[1]) Fall 2 und 7.

[2]) *Staub*, der unseren Befund des Eintritts einer Bluteindickung nach Insulininjektion beim Diabetes mel. bestätigt, fand diese Erscheinung auch späterhin *unmittelbar* nach jeder neuerlichen Insulininjektion. Auch wir sahen das Gleiche. Nur wird diese *vorübergehende* Bluteindickung mit der nach längerdauernder Insulinbehandlung eintretenden Wasseranreicherung der Gewebe und des Blutes immer weniger deutlich.

der Insulinwirkung, wie wir uns überzeugen konnten, meist nur nach den ersten Injektionen so deutlich ausgesprochen.

Die zweite Phase der Insulinwirkung betrifft das Absinken der *Nüchternwerte* und Tagesmittelwerte der Blutkonzentration (Absinken der Erythrocyten, des Serumeiweißgehalts und der Trockensubstanz) nach länger andauernder Insulinbehandlung gegenüber den Nüchternwerten vor der Behandlung. Gleichzeitig erfolgt fast stets ein Anstieg des Blutkochsalzgehalts. Die Gefrierpunktserniedrigung wird meist etwas kleiner. Die NaCl-Zunahme im Blute kompensiert diesbezüglich zum größten Teile die Abnahme der übrigen gelösten Substanzen. Die Serumviskosität nimmt in dieser Phase ab, die Oberflächenspannung des Serums zu. Die Änderung der Blutbeschaffenheit ist in dieser Phase um so größer, je größer die Insulindosis, je schwerer der Diabetes, je größer die Polyurie und die Wasserverarmung des Organismus in der Periode vor der Insulinbehandlung ist. Sie ist besonders groß bei Fällen, die im Stadium der Acidämie, des Koma oder Präkoma in Behandlung kommen. Doch besteht kein strenger Parallelismus zwischen der geschilderten Änderung der Blutbeschaffenheit und dem Grade der Änderung der Alkalireserve des Blutes. Das Verhalten von Trockensubstanz, Erythrocyten, Serumeiweißgehalt und zum Teil auch das der Gefrierpunktserniedrigung zeigen direkt die Blutverwässerung an. Die Änderung von Viskosität und Oberflächenspannung des Serums hängen aber wohl auch zum Teil mit der unter Insulinwirkung eintretenden Änderung im Kolloidzustand der Serumeiweißkörper zusammen.

In der dritten Phase der Insulineinwirkung nach noch weiter anhaltender Insulinbehandlung geht die Wasseranreicherung des Blutes wieder zurück. Auch die Viskosität des Serums nimmt wieder zu und die Oberflächenspannung ab. Die Eigenschaften des Blutes nähern sich der Norm. Vielleicht entspricht diese Phase der Änderung der Blutbeschaffenheit der Phase der Insulinwirkung, in welcher die elektive Wasserretention geringer wird und mehr der Ansatz von Körpersubstanz (Eiweiß und Fett) überwiegt.

Diese geschilderte, in einzelnen Phasen unter Insulineinwirkung fast gesetzmäßig erfolgende Änderung der Blutbeschaffenheit ist nur bei schweren Fällen und hoher Dosierung des Insulins deutlich ausgesprochen. Bei leichten Fällen und Nichtdiabetikern, sowie bei geringer Dosierung des ersten sind die Änderungen viel weniger deutlich und lassen oft jede Gesetzmäßigkeit vermissen.

Frl. cand. med. *V. Grömer* danke ich an dieser Stelle bestens für ihre freundliche Mithilfe bei dieser Arbeit.

Datum	Insulinbehandlung	Körpergewicht kg	B. Z. Proz.	E. Z.	Ser.-Eiw. Proz.	Δ °C	NaCl mg-Proz.	Z	η	T. S. Proz.	Bemerkungen
1. *D.* Diabetes (schwerer Fall).											
30. X.	Vor Insulin	50,7	0,261	5 165 000	9,350	—0,58	443,40	120,0	2,40	20,38	Ketonurie, präkomat.
3. XI.		51,2	0,194	5 100 000	8,708	—0,56	485,81	112,3	2,20	17,82	„
12. XI.	Seit 9. XI. 55 Einh. Insulin*) pro die	54,5	0,290	3 665 000	7,416	—0,54	496,67	106,5	1,70	16,09	Keine Ketonkörper
19. XI.		53,8	0,336	3 810 000	7,632	—0,55	437,10	110,7	1,43	15,90	„ „
28. XI.		56,3	0,150	3 755 000	8,280	—0,57	432,16	107,1	1,57	17,44	„ „

*) Insulin *Burroughs* Wellcome und Norgine.
Abkürzungen: B. Z. = Blutzucker, E. Z. = Erythrocytenzahl, Ser.-Eiw. = Serumeiweißgehalt, Z = Tropfenzahl, η = Viskosität (η von Wasser = 1), T. S. = Trockensubstanz des Gesamtblutes.

Datum	Insulinbehandlung	Körpergewicht kg	B. Z. Proz.	E. Z.	Ser.-Eiw. Proz.	Δ °C	NaCl mg-Proz.	Z	η	T. S. Proz.	Bemerkungen
2. *S.* Diabetes (schwerer Fall).											
17. XII.	Vor Insulin	58,9	0,307	5 510 000	7,848	—0,59	425,45	112,7	1,68	20,69	Ketonurie
17. XII.**)	4 Std. nach Insulininj.*)	—	0,080	5 800 000	8,280	—0,56	401,84	113,8	1,48	21,61	„
28. XII.	Seit 18. XII. 40 bis 50 Einh. Insulin tägl.	63,8	0,243	4 885 000	7,536	—0,56	424,62	—	1,66	19,49	Keine Ketonkörper
2. I.		64,0	0,245	4 410 000	7,084	—0,61	512,42	—	2,00	19,59	„ „
15. I.		67,5	0,243	3 965 000	7,496	—0,60	486,16	112,5	1,74	19,73	„ „

*) Patient blieb weiter nüchtern. Insulindosis: 40 Einheiten (*Burroughs* Wellcome). — **) Es fanden hier demnach zwei Bestimmungen an einem Tage statt (*vor* und *nach* der ersten Insulininjektion! Der zweite Wert am 17. XII. fällt somit in gewissem Sinne aus der Serie heraus!

Datum	Insulinbehandlung	Körpergewicht kg	B. Z. Proz.	E. Z.	Ser.-Eiw. Proz.	Δ °C	NaCl mg-Proz.	Z	η	T. S. Proz.	Bemerkungen
3. *K.* Diabetes (schwerer Fall)											
24. X.	Vor Insulin	53,5	0,219	5 135 000	6,768	—0,58	397,00	108,45	2,00	20,94	Ketonurie
29. X	Ab 27. X. 50 bis 60 Einh. Insulin*) täglich	55,0	0,269	5 720 000	6,336	—0,61	474,40	110,20	1,90	20,51	„
4. XI.		59,5	0,232	4 330 000	6,552	—0,56	504,60	111,00	1,70	19,64	Keine Ketonkörper
12. XI.**)		60,2	0,210	4 170 000	6,828	—	488,76	—	—	17,63	
14. XI.		58,5	0,242	5 200 000	7,632	—0,58	373,38	107,20	1,66	20,00	
16. XI.		—	—	5 315 000	7,200	—	504,66	—	—	18,09	
17. XI.		60,3	0,246	4 720 000	6,984	—	502,40	—	—	18,27	
23. XI.		61,0	0,216	4 570 000	6,984	—	494,46	108,50	1,48	19,55	

*) Insulin zum Teil *Burroughs* Wellcome, zum Teil Norgine (nach Prof. *Wiechowski*). — **) Bis 12. XI. Kost von mittlerem NaCl-Gehalt (12 bis 15 g), vom 12. XI. bis 15. XI. Kost von niedrigem NaCl-Gehalt (3 bis 4 g), ab 15. XI. Kost von hohem NaCl-Gehalt (20 bis 22 g).

Datum	Insulinbehandlung	Körpergewicht kg	B. Z. Proz.	E. Z.	Ser.-Elw. Proz.	Δ °C	NaCl mg-Proz.	ϰ	η	T. S. Proz.	Bemerkungen
4. *V.* Diabetes (mittelschwerer Fall).											
22. X.	Vor Insulin	51,6	0,174	5 385 000	7,416	—0,60	428,23	108,6	1,55	19,55	Keine Ketonurie
3. XI.	Seit 25. X. 40 bis 50 Einh. Insulin *) täglich	53,6	0,199	4 395 000	8,280	—0,55	463,60	107,7	2,00	19,62	
12. XI. **)		54,5	0,250	4 310 000	8,554	—	469,05	—	—	—	
14. XI.		55,0	0,200	5 020 000	6,120	—0,57	396,40	107,4	2,22	18,72	
16. XI.		55,0	—	5 350 000	8,420	—	422,50	—	—	19,18	
17. XI.		55,9	0,294	4 780 000	8,280	—	522,72	—	—	19'06	
23. XI.		56,5	0,154	4 640 000	8,064	—0,60	511,44	107,3	1,48	18,16	
5. *S.* Diabetes (schwerer Fall).											
15. X.	Vor Insulin	58,0	0,193	4 840 000	7,336	—0,570	363,40	108,4	1,53	19,25	Ketonurie
20. X.	Ab 18. X. 60 bis 70 Einh. Insulin pro Tag	61,5	0,242	4 180 000	5,764	—0,580	443,40	106,8	1,33	18,20	Keine Ketonkörper
31. X.		63,0	0,203	3 890 000	6,120	—0,540	479,90	109,5	1,40	18,45	„ „
6. XI.		61,2	0,166	4 250 000	6,828	—0,560	—	109,5	1,48	—	„ „
19. XI.		62,8	0,251	5 395 000	6,848	—0,555	478,10	107,4	1,60	18,55	„ „
21. XI.		—	0,152	4 570 000	6,768	—	434,25	107,2	1,60	18,81	„ „
6. *St.* Diabetes (leichter Fall).											
19. XI.	Vor Insulin	56,3	0,292	4 940 000	6,612	—0,555	460,46	107,8	2,00	19,01	
1. XII.		56,0	0,192	5 470 000	7,410	—0,545	402,18	110,8	1,73	20,54	
9. XII.	ab 4. XII. 40 E. Insulin tgl.	56,1	0,154	4 566 000	7,642	—0,580	458,51	112,5	1,40	20,91	
7. *C.* Diabetes (schwerer Fall, präkomatös).											
19. I.	Vor Insulin	55,7	0,408	5 330 000	8,494	—0,625	496,5	114,5	1,54	22,8	Starke Ketonurie, präkomatös
21. I.	Ab 20. I. 80 bis 100 Einh. Insulin täglich	57,3	0,209	4 160 000	6,880	—0,600	527,4	110,9	1,44	20,4	Alkalireserve des Blutes: 27,0
23. I.		61,2	0,305	4 290 000	6,336	—0,595	497,2	110,9	1,48	16,8	Keine Ketonurie
26. I.		60,6	0,284	3 870 000	6,336	—0,575	522,0	111,5	—	16,0	
29. I.		61,4	0,212	3 780 000	6,450	—0,600	534,3	112,0	1,54	—	
2. II.		62,1	0,148	3 810 000	5,902	—0,580	511,0	110,6	1,44	17,8	

*) Insulin Norgine. — **) Bis zum 12. XI. Kost von mittlerem NaCl-Gehalt (12 bis 15 g), vom 12. XI. bis zum 15. XI. Kost von niederem NaCl-Gehalt (3 bis 4 g), ab 16. XI. Kost von hohem NaCl-Gehalt (20 bis 22 g).

Datum	Insulinbehandlung	Körpergewicht kg	B. Z. Proz.	E. Z.	Ser.-Eiw. Proz.	Δ °C	NaCl mg-Proz.	z	η	T. S. Proz.	Bemerkungen
	8. *M*. Diabetes (mittelschwer).										
1. XI.	Vor Insulin	70,0	0,289	4 900 000	8,494	— 0,580	510,68	112,3	2,00	—	
5. XI.	Ab 3. XI. 50 bis 60 Einh. Insulin tägl.	70,0	0,168	4 250 000	7,000	— 0,545	578,27	107,8	1,73	19,21	
18. XI.		71,0	0,254	4 295 000	7,416	— 0,595	489,06	107,8	1,43	18,65	
	9. *S*. Diabetes (Coma diabet.)										
3. I.	Stadium comatosum	—	0,557	5 780 000	9,470	— 0,680	503,67	116,5	2,50	21,93	Ketonurie, Alkalireserve: 20,2
	10. *F*. Diabetes (mittelschwer).										
5. XII.	Vor Insulin	50,0	0,238	4 865 000	7,632	— 0,580	471,57	107,8	1,90	21,95	
13. XII.	Seit 6. XII. 30 Einh. Insulin täglich	53,2	0,186	4 670 000	8,064	— 0,570	530,19	113,0	1,62	19,18	
	11. *Ma*. Tbc. der Lunge.										
9. XI.	Vor Insulin	42,4	0,079	5 240 000	7,848	— 0,550	494,20	109,9	2,66	20,55	
21. XI.	Ab 11. XI. 60 Einh. Insulin täglich	44,2	0,092	5 610 000	7,842	— 0,590	434,89	111,2	1,53	18,88	
1. XII.		45,4	0,088	5 045 000	7,842	— 0,555	451,64	—	1,60	—	
	12 *T*. Tbc. pulm.										
21. XII.	Vor Insulin	60,8	0,082	6 050 000	7,848	— 0,560	522,43	115,6	1,66	18,56	
28. XII.	Seit 21. XII. 60 Einh. Insulin täglich	62,6	0,074	5 665 000	—	— 0,565	502,76	—	1,61	19,54	
2. I.		64,3	0,097	4 900 000	7,868	— 0,580	481,12	113,3	1,90	17,79	

Refraktometrische Studien über den Abbau fötaler Organproteine.

Von

Oskar Kanner[1]).

(Eingegangen am 19. Februar 1926.)

Nachdem der Einfluß des Serums auf Carcinomzellen ursprünglich durch *Freund* und *Kaminer* mikroskopisch und durch *Neuberg* mittels N-Bestimmung der Eiweißabbauprodukte erwiesen war, hat das Studium der Serumeinwirkung auf Zellenmaterial durch *Abderhalden* als „*Abderhalden*sche Abbaureaktion" allgemeine Bedeutung gewonnen.

Die *Abderhalden*sche Reaktion hat im Laufe der Zeit eine größere Reihe von Veränderungen durchgemacht; an die Stelle der Dialyse wurde die Enteiweißung gestellt (*Freund-Kaminer*, Gynäk. Kongreß 1913), an Stelle des feuchten Zellmaterials nach *Pregl* entfettetes Material und statt der Ninhydrinreaktion die refraktometrische Ablesung.

Die Nachuntersuchung des Serums bei Carcinom nach der *Freund-Kaminer* und der *Abderhalden*schen Reaktion hat nun in Bestätigung der ursprünglichen Angaben doch scheinbar widersprechende Verhältnisse festgestellt.

Nach *Freund-Kaminer* fehlt im Carcinomserum die im Normalserum vorhandene Carcinomzellen zerstörende Substanz, und es ist sogar eine Carcinomzellen erhaltende vorhanden, nach *Abderhalden* baut aber das Carcinomserum Carcinomzellen ab.

Den Schlüssel zur Aufklärung dieses scheinbaren Paradoxon hat *Freund* geliefert, indem er darauf hinwies, daß bei der *Freund-Kaminer*-Probe *natives* Zellmaterial, bei der *Abderhalden*-Probe aber *gekochtes* Zellmaterial verwendet wird, und nachweisen konnte, daß Carcinomserum *native* Carcinomzellen schützte, aber gekochte Carcinomzellen löste.

Die Substanz, die bei der *Abderhalden*schen Reaktion abbaut, ist dieselbe, die native Carcinomzellen vor Zerstörung durch Normalserum schützt. Für die Identität der Substanz spricht auch, daß beide Wirkungen an das Nucleoglobulin des Carcinomserums gebunden sind.

Daraus ergibt sich, daß nur die cytolytische Reaktion ein Bild der wirklichen Vorzüge im Körper gibt.

---

[1]) Diese Arbeit wurde auf der Prosektur der Krankenanstalt Rudolfsstiftung (Vorstand weiland Hofrat *Paltauf*) ausgeführt.

Das Fehlen der Normalsubstanz ist nicht das Charakteristische des Carcinomserums, sondern nur ein Teilfaktor, eine Vorbedingung; nach Untersuchungen von *Kaminer* nimmt die zerstörende Fähigkeit des Normalserums mit zunehmendem Alter konstant ab, um im Greisenalter sogar unter die Norm des Erwachsenen abzusinken, was mit der Altersdisposition für Carcinom in gutem Einklang steht. Das für das Carcinom Wesentliche, das Charakteristische ist aber erst das Auftreten der die Carcinomzellen schützenden Substanz, die zugleich die *Abderhalden*sche Reaktion gibt[1]).

Es schien von Interesse, nachzusehen, ob es außer dem Carcinomprotein noch andere Eiweißarten gibt, die gegenüber dem Serum Krebskranker die gleiche spezifische Abbaufähigkeit besitzen. Vielfach wurden Parallelen gezogen zwischen Tumorkranken und Graviden, das selbständige, in sich abgeschlossene Wachstum des Embryo könnte mit dem Wachstum einer Geschwulst verglichen werden, ja sogar mit dem einer bösartigen Geschwulst, wenn man an das infiltrierende Wachstum des Chorions in die Uterusschleimhaut denkt. Dazu kommen noch die Analogien im Stoffwechsel Schwangerer und Carcinomkranker, wie das Verhalten bei der Kobragifthämolyse, der vermehrte Antitrypsingehalt des Blutes, die Lipämie und gewisse morphologische Veränderungen an Nebennieren, Schilddrüse und Hypophyse. In diesem Sinne haben *Kraus* und *Ishiwara* das Verhalten von Embryonalzellen und Carcinomzellen in bezug auf das Serum Normaler und Carcinomkranker untersucht. Sie verwendeten dazu die Methode von *Freund* und *Kaminer* und fanden bei dieser Arbeitsweise Analogien und eine Verschiedenheit: 1. Embryonalzellen (Leber) werden vom Serum Nichtcarcinomatöser ebenso gelöst wie Carcinomzellen. Im Gegensatz dazu stehen die Zellen Erwachsener. 2. Embryonalzellen werden vom fötalen Serum ebensowenig gelöst wie Carcinomzellen. 3. Das Serum Carcinomkranker, das nicht imstande ist, Carcinomzellen aufzulösen, löst embryonale Zellen sowie das Serum eines Nichtcarcinomatösen.

Da nun das Verhalten embryonaler Gewebe im Vergleich zum Krebsgewebe bisher nur mit Anwendung der cytolytischen Reaktion untersucht worden ist, bei der ja das eigentlich für das Carcinom charakteristische Agens nicht mitwirkt, war es von Interesse, die *Abderhalden*sche Reaktion dafür in Anwendung zu bringen. Die

[1]) Bei diesem Sachverhalt erscheint es unberechtigt, wenn *Sellheim* die Hoffnung ausspricht, mit Hilfe der bei der *Abderhalden*schen Reaktion tätigen Stoffe auch therapeutisch wirken zu wollen. Es erschiene aussichtsreicher mit dem zellzerstörenden Agens des Normalserums zu arbeiten. könnte diese Substanz ja die Ursache einer therapeutischen Wirkung sein. die nicht nur in alter Zeit von Transfusionen behauptet wurden, sondern auch in neuerer Zeit von *Bier* und *Beebe* angegeben wurden.

folgenden Untersuchungen sind nach der Mikro-Abderhaldenmethode von *Pregl* und *de Crinis* mit Hilfe des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers ausgeführt worden. Das embryonale Material wurde aus der Leber eines sechsmonatlichen Fötus gewonnen. Zur Untersuchung gelangten Sera Carcinomatöser, Nichtcarcinomatöser (insbesondere Kachektischer), Gravider und Neugeborener.

Es wurde darauf verzichtet, aus den abgelesenen Werten der Refraktometerskala den wirklichen Brechungsexponenten mit Hilfe der Tabellen zu bestimmen, da es ja nur auf eine Differenz der Refraktion ankam, die sich ebensogut in Skalenteilen ausdrücken ließ. Somit konnte auch darauf verzichtet werden, die Ablesungen stets bei einer Temperatur von 17,5° C vorzunehmen. Es genügte, die bei der ersten Ablesung herrschende Temperatur festzustellen und bei der zweiten Ablesung dieselbe Temperatur wieder herzustellen.

Das Blut wurde nüchternen Patienten durch Venenpunktion entnommen, hierauf zwecks Vermeidung von Nachgerinnung 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Im übrigen wurden die Originalvorschriften von *Pregl* und *de Crinis* genau befolgt.

I. Nichtkachektische Nichtcarcinomatöse.

Tabelle I.

Nichtkachektische Nichtcarcinomatöse.

Nr.		Anfangswert	Nach 24 Stdn.	Differenz in Hundertstel Skalenteilen
1	Gonorrhoe	60,10	60,10	0
2	„	57,45	57,50	+ 0,05
3	„	58,15	58,15	0
4	Sec. Lues	56,20	56,30	+ 0,10
5	„ „	54,90	54,90	0
6	„ „	56,80	56,75	— 0,05
7	„ „	60,20	60,10	— 0,10
8	Myxödem	56,30	56,30	0
9	Ulcus ventric.	52,50	52,50	0
10	„ „	54,65	54,60	— 0,05

Aus Tabelle I geht hervor, daß die Sera nichtcarcinomatöser Nichtkachektischer nicht imstande waren, das embryonale Leberprotein abzubauen. Die kleinen Differenzen entsprechen wohl der Fehlerbreite.

Zehntel-Skalenteile können beim *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer mit Hilfe des Nonius noch abgelesen werden. Die Hundertstel werden geschätzt. Zeigte nun die Bestimmung einen Wert an, der sich zwischen zwei Teilstrichen des Nonius, etwa gleich weit von jedem befand, so schien es praktisch, dies als fünf Hundertstel in Rechnung zu setzen; war dies nicht der Fall, so mußte man den dem wahren Wert näherliegenden Teilstrich zur Messung heranzuziehen. So erklären sich die kleinen Differenzen in Tabelle I.

II. Kachektische Carcinomkranke.

Mit Ausnahme der in der Tabelle I angeführten Untersuchungen habe ich stets Doppelbestimmungen vorgenommen, um auf diese Weise akzidentelle Fehler zu vermeiden. Nur in zwei Fällen erhielt ich widersprechende Resultate, die das eine Mal auf bakterieller Verunreinigung beruhten, während für das zweite Mal die Verursachung nicht gefunden werden konnte. Diese beiden Fälle wurden ausgeschieden. Die Richtigkeit der Diagnose Carcinom ist in jedem einzelnen Falle durch Probeexzision, Operation oder Obduktion festgestellt worden.

Tabelle II.

Kachektische Carcinomkranke.

Nr.			Anfangswert	Nach 24 Stdn.	Differenz in Hundertstel Skalenteilen
1	Mammae	a)	59,80	60,10	+ 0,30
		b)	59,50	59,85	+ 0,35
2	Ventriculi	a)	49,50	49,95	+ 0,45
		b)	50,00	50,45	+ 0,45
3	"	a)	62,90	63,25	+ 0,35
		b)	62,70	63,10	+ 0,40
4	"	a)	49,40	49,75	+ 0,35
		b)	49,50	49,85	+ 0,35
5	"	a)	53,05	53,50	+ 0,45
		b)	53,10	53,50	+ 0,40
6	Pancreatis	a)	49,70	50,05	+ 0,30
		b)	49,70	50,00	+ 0,30
7	Recti	a)	55,65	55,95	+ 0,30
		b)	55,40	55,75	+ 0,35
8	Lupuscarzinom	a)	51,40	51,70	+ 0,30
		b)	51,40	51,70	+ 0,30
9	Intestini crassi	a)	52,55	52,90	+ 0,35
		b)	52,80	53,10	+ 0,30
10	Peritonei	a)	49,00	49,70	+ 0,70
		b)	49,60	50,20	+ 0,60

Tabelle II zeigt, daß alle zur Untersuchung gelangten Sera *kachektischer* Carcinomkranker das angebotene fötale Leberprotein abgebaut haben. Die beim gleichen Fall vorhandenen Differenzen bei der ersten Ablesung beruhen auf Fehlern der Technik und haben für den Ausfall der Reaktion keine Bedeutung. Das Organprotein wird nämlich mit physiologischer Kochsalzlösung zum Quellen gebracht. Nach einer Stunde wird die Kochsalzlösung abgesaugt und das Serum hinzugefügt. Von der Gleichmäßigkeit, mit der die Entfernung der Kochsalzlösung gelingt, hängt der refraktometrische Ausgangswert ab. Für die Beurteilung der Reaktion ist nur die Differenz gegen die zweite Ablesung nach 24 Stunden von Belang.

III. Nichtkachektische Carcinomkranke.

Tabelle III.

Nichtkachektische Carcinomkranke.

Nr.			Anfangswert	Nach 24 Stdn.	Differenz in Hundertstel Skalenteilen
1	Baseos linguae . .	a)	57,20	57,20	0
		b)	56,80	56,85	+ 0,05
2	Bronchi	a)	62,25	62,25	0
		b)	61,20	61,20	0
3	Ventriculi	a)	53,20	53,20	0
		b)	53,70	53,70	0

Die Tabelle III zeigt, daß in drei Fällen von Carcinom, bei denen *keine Kachexie* vorhanden war, der Abbau im Gegensatz zu den zehn Fällen der Tabelle II, wo jedesmal Kachexie vorhanden war, ausblieb.

IV. Nichtcarcinomatöse Kachektische.

Tabelle IV.

Nichtcarcinomatöse Kachektische.

Nr.			Anfangswert	Nach 24 Stdn.	Differenz in Hundertstel Skalenteilen
1	Pericarditis	a)	57,75	58,15	+ 0,40
		b)	57,60	58,05	+ 0,45
2	Tuberculosis pulmon.	a)	51,30	51,60	+ 0,30
		b)	50,45	50,75	+ 0,30

In der Tabelle IV figurieren bloß zwei Fälle. Während bei den Carcinomfällen die Diagnose autoptisch sichergestellt war, wurde in diesen zwei Fällen die Abwesenheit eines Carcinoms nur klinisch erschlossen.

De Crinis und *Mahnert* haben die Abbaufähigkeit von Lebergewebe Erwachsener refraktometrisch untersucht. Dabei kamen sie zu folgenden Ergebnissen: „In allen Fällen von Carcinom mit gleichzeitiger Kachexie fand sich Abbau von Lebereiweiß. In jenen Fällen, in welchen klinisch eine Kachexie nicht vorhanden war, fehlte auch der Abbau von Lebereiweiß. Abbau von Lebereiweiß fand sich auch in den untersuchten Kontrollfällen von Kachexie auf andersartiger, auch nicht tumoröser Grundlage."

Somit kann ich zusammenfassend sagen: *Embryonales Lebergewebe verhält sich bei der Abderhaldenschen Reaktion genau so wie das Lebergewebe Erwachsener. Es zeigt die gleiche Abbaufähigkeit gegenüber dem Serum Kachektischer wie das gereifte, ohne im mindesten eine für das Krebseiweiß charakteristische Eigenschaft zu besitzen.*

Diese Feststellungen haben vielleicht noch auf einem anderen Gebiet ein gewisses Interesse. Man spricht vielfach von einer physiologischen Unreife der Leber des Neugeborenen und hat auch versucht, diese Annahme zur Erklärung des Ikterus neonatorum heranzuziehen. Meine Untersuchungen

sprechen nicht für diese Unreife, da sich ja das embryonale Lebereiweiß von dem „reifen" in nichts unterschieden hat und das gleiche eigentümliche Verhalten gegenüber dem Serum Kachektischer gezeigt hat. Man muß jedoch zugeben, daß ein Unterschied vorhanden ist, der ja in der erwähnten Arbeit von *Kraus* und *Ishiwara* zutage getreten ist, indem Normalserum embryonale *native* Leberzellen löst, während die Zellen Erwachsener nicht gelöst werden.

Ich habe auch andere fötale Gewebe in den Rahmen der Untersuchung einbezogen, nämlich Niere, Mamma und Magen. Dabei hat sich in keinem Falle, mit keinem Serum ein Abbau gezeigt. Die Sera Schwangerer (Mitte und Ende der Schwangerschaft) zeigten gegen embryonales Gewebe, sei es Leber, Niere, Mamma oder Magen keine Abbaufähigkeit. Ebensowenig Nabelschnurblut.

Zum Schluß sei es gestattet, einige Details technischer Natur hervorzuheben. Bei der Reaktion kommt es nicht allein auf steriles Arbeiten an (bakterielle Verunreinigungen können die Beurteilung der Reaktion verhindern), sondern auch auf chemische Reinlichkeit. Die Röhrchen, in denen sich die Reaktion zwischen Serum und Organpulver abspielt, wurden nach dem gewöhnlichen Waschen mit Schwefelsäure-Kaliumbichromat gereinigt, dann gründlich mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült und staubgeschützt getrocknet. Das gewöhnliche Kochsalz ist nicht hinlänglich rein. Es empfiehlt sich, Analysenkochsalz zu verwenden. Die Außerachtlassung dieser Regeln führt zu Fehlresultaten. So fanden *Koritschoner* und *Morgenstern*, daß Serum allein beim Stehen seinen Brechungsexponenten ändern könne; manche Sera erniedrigten ihren Wert, manche erhöhten ihn, bei anderen wieder blieb er unverändert. Deshalb müsse man eine Änderung des Serums gesondert bestimmen und beim Gesamtresultat ins Kalkül ziehen. Im Gegensatz dazu geben *Pregl* und *de Crinis* an, daß eine solche Veränderung nicht stattfinde. Es ist mir gelungen, die Befunde von *Koritschoner* und *Morgenstern* zu reproduzieren, wenn ich auf eine gründliche Reinigung der Röhrchen verzichtete; tat ich das nicht, stimmten meine Ergebnisse in mehr als 30 Fällen mit den Angaben von *Pregl* und *de Crinis* überein. *Koritschoner* und *Morgenstern* haben mit nativen Zellen gearbeitet und den Ausfall der *Freund-Kaminer*schen Reaktion refraktometrisch zu bestimmen versucht. Dabei fanden sie, daß sich der Brechungsexponent des Systems Zellen + physiologische Kochsalzlösung (ohne Serum) häufig spontan ändere, manchmal in positivem, manchmal in negativem Sinne, zuweilen gar nicht. Dabei gelangten stets dasselbe Zellmaterial und dieselbe Kochsalzlösung zur Verwendung. Auch ich konnte mit dem denaturierten Eiweiß solche Resultate erhalten, selbst nach gründlicher Reinigung der Röhrchen. Wenn ich aber das gewöhnliche Kochsalz durch Analysenkochsalz ersetzte, hörten diese Sonderbarkeiten auf. Herr Dr. *Koritschoner* hatte die Liebenswürdigkeit, mir auf meine Anfrage mitzuteilen, daß er bei seiner Arbeit die Röhrchen nur durch Spülung mit Leitungswasser zu reinigen pflegte und Speisesalz in Anwendung brachte.

Zusammenfassung.

1. Denaturiertes embryonales Organeiweiß wird a) weder vom Serum Carcinomatöser, b) noch vom Serum Nichtcarcinomatöser abgebaut.

2. Eine Ausnahme hiervon zeigt jedoch das fötale Lebergewebe insofern, als es regelmäßig vom Serum Kachektischer abgebaut wird, gleichgültig, ob das Serum von einem Carcinomatösen oder Nichtcarcinomatösen stammt, so wie nach *de Crinis* und *Mahnert* das Lebereiweiß Erwachsener sich verhält.

Literatur.

de Crinis und *Mahnert, Pregl* und *de Crinis,* Zeitschr. f. Fermentforsch. 1ff. — *G. Kaminer,* Wien. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 13. — *Koritschoner* und *Morgenstern,* diese Zeitschr. **104**, 1920. — *Koritschoner,* ebendaselbst **129**, 1922.

Über feinporige Filter und neue Ultrafilter.

Von

R. Zsigmondy.

(Aus dem Institut für anorganische Chemie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 20. Februar 1926.)

Von *Malfitano* und *Duclaux* wurden Kollodiumhäutchen als Filter bei der Untersuchung kolloidaler Lösungen angewandt. Die Festigkeit derartiger Filme war jedoch ziemlich gering, ebensowenig waren sie hinsichtlich ihrer Porengrößen definiert. Einen Fortschritt stellte demgegenüber ein Verfahren von *Bechhold* dar. Dieser imprägnierte Papierfilter mit Kollodium, das in Eisessig gelöst war. Die so behandelten Filter können, da sie auf einer Unterlage zur Verwendung kommen, stärker beansprucht werden und sind auch durch verschiedenartige Behandlung bei der Herstellung mit verschiedener Porenweite zu erhalten.

Beide Arten von Filtern ließen jedoch bei den ursprünglich vorhandenen Einrichtungen nur geringe Filtrationsgeschwindigkeit zu. Diesem Nachteil suchte ich zunächst durch die Konstruktion eines Filtrationsapparats (1) mit großer Filtrierfläche zu begegnen.

Die immer noch langsame Filtration veranlaßte mich in Gemeinschaft mit *W. Bachmann* (2) sehr schnell filtrierende Filter (die Membranfilter) herzustellen (3), deren Porengröße zwischen denen der Porzellanfilter und der Kollodiumhäutchen liegt. Je nach den Bedingungen bei der Darstellung können sie mit verschieden weiten Poren hergestellt werden. Da es möglich ist, schnell filtrierende Membranen sehr verschiedener Porenweiten mit glatter Oberfläche zu erhalten, sind sie auch für analytische und präparative Zwecke sehr geeignet.

Je nach der gewünschten Verwendung werden Filter mit feineren oder gröberen Poren angewandt (3). Die durchlässigsten Membranfilter sind imstande, frisch gefälltes Bariumsulfat zurückzuhalten; desgleichen kann man gallertige, flockige Niederschläge (z. B. Hydrogele von Aluminium, Eisen, Chrom) schnell abfiltrieren und waschen und die Rückstände mühelos quantitativ entfernen. Selbst schleimige (andere Filter verstopfende) Niederschläge, wie Zinksulfid, können

leicht abfitriert werden (4a). Dafür verwendet man zweckmäßig die etwas dichteren Membranfilter. Von diesen Möglichkeiten machen eine Reihe neuartiger analytischer Verfahren Gebrauch, die besonders von *G. Jander* (4c bis g) und seinen Schülern (4o bis q) ausgearbeitet wurden. Diese führten vielfach zu sehr einfachen, schnell auszuführenden Bestimmungsmethoden bei Körpern, bei deren Analyse vorher erst langwierige Verfahren nötig waren.

Membranfilter sind auch bakteriendicht herzustellen, was besonders für biologische, klinische und toxikologische Zwecke vorteilhaft ist. Zu derartigen Untersuchungen wurden Membranfilter in der Tat vielfach mit Erfolg angewandt (5a bis i; Referate s. 4b und 4h bis m und 12b bis c).

Später gelang es mir, Ultrafilter mit sehr feinen Poren für besondere Zwecke herzustellen. Derartige Filter werden als *Ultrafeinfilter* bezeichnet und sind vielfach im Institut für anorganische Chemie verwendet worden. Die Herstellung erfolgt im wesentlichen nach dem Verfahren von *Zsigmondy* und *Bachmann*, allerdings von anderen Rohmaterialien ausgehend. Variationen des Darstellungsvorganges bedingen auch hier die Gewinnung von Filtern verschiedener Eigenschaften und Porenweiten. Wie bei allen Filtern, sind auch bei den Ultrafeinfiltern nicht alle Poren gleich weit, sondern liegen teilweise oberhalb und unterhalb eines gewissen Mittelwertes; die mittleren Porenweiten derartiger Filter hängen, wie gesagt, von Variationen des Herstellungsverfahrens ab, die im allgemeinen nach Wunsch reguliert werden können.

Zur Prüfung der Porenweiten stehen uns, ebenso wie bei den Membranfiltern, verschiedene Mittel zur Verfügung (7). Die Durchlässigkeiten der Ultrafeinfilter sind am besten charakterisiert durch ihr Verhalten gegen Farbstoffe. Die Ultrafeinfilter mit den relativ gröbsten Poren lassen aus wässerigen Lösungen von Benzopurpurin 4 B den Farbstoff hindurchtreten und färben sich dabei an. Dichtere Ultrafeinfilter halten aus diesen Lösungen den Farbstoff vollkommen zurück, wobei sie sich entweder überhaupt nicht oder nur stellenweise anfärben. Die feinstporigen Ultrafeinfilter halten nicht nur Benzopurpurin 4 B vollkommen zurück, sondern sind sogar imstande, im Wasser gelöstes Kongorot derart abzufiltrieren, daß der Farbstoff auf dem Filter als Paste zurückbleibt. Das Filtrat und das Filter bleiben dabei farblos (6) (7).

Weniger feine Filter derselben Art färben sich aber mit den Farbstoffen an und werden intensiv gefärbt. Welche Schlüsse man daraus für die Theorie der Semipermeabilität und der Färberei ziehen kann, ist in der fünften Auflage meines Lehrbuchs der Kolloidchemie 1925, Kap. 25, gezeigt.

Die Dichtigkeit derartiger Filter macht sie auch geeignet zu Membranen für Osmometer, wenn sehr feinteilige kolloide Lösungen zu untersuchen sind, z. B. wurden Ultrafeinfilter in Verbindung mit dem von *Donnan* und *Harris* angegebenen Osmometer mehrfach mit Vorteil benutzt (6).

Es sei hier besonders hervorgehoben, daß sogar der die elektrische Leitfähigkeit bedingende Farbstoff so weit zurückgehalten wird, daß das Filtrat nicht viel besser leitet als das zur Lösung benutzte Wasser selbst, vorausgesetzt, daß der Farbstoff nicht Verunreinigungen enthält. Solche gefärbten Ionen, die das Filter nicht durchdringen, sind in der Regel Mizellionen, also nicht einfache Elektrolytionen gewöhnlicher Art, sondern häufig aus einer Anzahl von Molekülresten zusammengesetzt und mehrwertig. Die Anwendbarkeit der Filter zur Untersuchung des Lösungszustands der Farbstoffe in wässerigen Lösungen ist in einer besonderen Abhandlung besprochen (6).

Ultrafeinfilter, die sich Lösungen von Kongorot gegenüber als dicht erweisen, sind in der Regel auch dicht gegen Eiweiß. Z. B. kann mit derartigen Filtern das Eiweiß aus dem Blutserum derart weitgehend abfiltriert werden, daß sehr empfindliche Eiweißproben negativ ausfallen. Da die Eiweißzerteilungen dabei keinerlei chemischen Eingriffen ausgesetzt sind, stellt diese Möglichkeit einen einfachen Weg dar, unter weitgehender Schonung des Untersuchungsmaterials, Körperflüssigkeiten das Eiweiß zu entziehen (5i und 10).

Aus Lösungen hoher molekularer Stoffe (z. B. Na-Heptylat und Na-Nonylat), die zur Kolloidbildung neigen, läßt sich mit Hilfe der Ultrafeinfilter der kolloid gelöste Anteil von dem kristalloid gelösten teilweise trennen. Eine derartige Anwendung fanden die Filter unter anderem bei einer Untersuchung von *Leeten* (8c), der zeigte, daß bei der Ultrafiltration einer wässerigen Lösung von ölsaurem Natrium der größte Teil des Salzes auf dem Filter blieb, also kolloid gelöst war. Die Natriumsalze der mittleren Fettsäuren lassen sich durch Filtration konzentrieren (8a u. 8b). Weitere Anwendungen s. 8d.

Mit Hilfe derartiger Filter gelang *Wintgen* und *Löwenthal* (9) bei der Untersuchung *sehr feinteiliger* Hydrosole von Chromoxyd die für die Aufklärung der Mizelladung sehr wichtige Trennung der Mizelle von der intermizellaren Flüssigkeit. Kollodiumhäutchen erwiesen sich in diesem Falle als unzureichend.

Kristalloid gelöste Körper (z. B. Kochsalz, Harnstoff, Zucker) durchdringen selbst die dichtesten Ultrafeinfilter. Jedoch gelang es *Brukner*, in Lösungen von Rohrzucker mit Hilfe eines besonders dichten Ultrafeinfilters, durch Filtration die Konzentration der auf dem Filter verbleibenden Lösungen etwas zu erhöhen, d. h. den Rohrzucker durch Filtration in einer Lösung anzureichern (11).

Die relativ geringe Filtrationsgeschwindigkeit der feinstporigen Filter selbst bei Anwendung eines Vakuums machte es wünschenswert, die Filtrationsdauer abzukürzen. Dieses führte zunächst zur Konstruktion von Filtrationsapparaten für hohe Drucke bis über 100 Atm. Weiterhin wurde durch Anwendung elektromagnetischer Rührvorrichtungen die Filtration wesentlich beschleunigt. Die Anwendung und Konstruktion derartiger Einrichtungen geht zurück auf Arbeiten meiner Schüler *B. Brukner* und *W. Overbeck* (12).

Die sehr wechselnde Filtrationsgeschwindigkeit der Fette gegenüber Wasser sagt aber über die Brauchbarkeit derselben wenig aus. Manchmal halten Filter, die Wasser schneller durchtreten lassen als andere, Kongorot besser zurück als diese (langsameren). Öfter geht aber die Dichtigkeit gegen Wasser der gegen Ultramikronen parallel.

Sind die Filter noch gallertig, stark porös, so genügt oft schon Filtration von Wasser unter Druck, um sie etwas zu dichten und langsamer filtrierend zu machen (10). Sehr dichte Filter ändern nur wenig ihre Filtrationsgeschwindigkeit gegen Wasser durch erhöhten Druck.

Weit wichtiger ist die Verlangsamung durch Bildung zäher Massen auf dem Filter, die die lyophilen Kolloide häufig bei der Filtration hinterlassen. Serum kann z. B. durch Druckfiltration zu einer mehrere Millimeter dicken, zähen, elastischen Platte eingedickt werden (Versuch des Verfassers). Ähnliches fanden *Brukner* und *Uhlenbruck* (10), die den Filterrückstand ohne Verlust von dem Filter abziehen konnten. Hier wirkt die Druckfiltration unter Anwendung von Rührvorrichtungen sehr beschleunigend (10).

Während sich wässerige Lösungen (falls sie nicht stark sauer oder alkalisch sind) durch Membran- und Ultrafeinfilter einwandfrei filtrieren lassen, vertragen diese häufig nicht die Benutzung von organischen Lösungsmitteln. Es gelang indes dem Verfasser zusammen mit Dr. *E. Kratz*, Filter herzustellen, durch die man Lösungen in organischen Lösungsmitteln, z. B. in Alkohol, Äther, Aceton und Essigsäure filtrieren kann, ohne daß die Membranen Schaden leiden. Diese sogenannten „Zellafilter“ sind auch gegen Alkalien und starke Säuren erheblich widerstandsfähiger als die Membran- und Ultrafeinfilter. Da auch die Zellafilter in verschiedenen Porenweiten hergestellt werden können, sind sie sehr geeignet zur Untersuchung kolloider Lösungen in organischen Lösungsmitteln. So hielt z. B. ein sehr dichtes Filter dieser Art aus einer Lösung von Nitrocellulose in Aceton den gelösten Anteil weitgehend zurück, so daß das Filtrat nahezu frei davon war. Es ist dies ein Beweis für die kolloide Natur derartiger Systeme.

Auch für Osmometer lassen sich Membranen und Säckchen herstellen, die durch organische Lösungsmittel nicht angegriffen werden. Damit ist die Dialyse und Bestimmung des osmotischen Druckes

kolloider Lösungen in organischen Solvenzien bequem zugänglich gemacht worden, was besonders für die Untersuchung von Kautschuklösungen von Bedeutung sein dürfte (14). Früher schon haben *Duclanx* und *Wollmann* (13) den osmotischen Druck von Nitrocelluloselösungen bestimmt.

Literatur.

1) Zeitschr. f. angew. Chem. **26**, 447, 1913. — 2) *R. Zsigmondy* und *W. Bachmann*, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **103**, 119 bis 128, 1918; zitiert im Chem. Centralbl. **1918**, II, 430. — 3) Die Herstellung (D. R.-P. Nr. 329117) geschah ursprünglich durch die Firma *E. de Haen* (Seelze); alle Filter werden jetzt von Dr. *E. Kratz*, Göttingen, Hospitalstraße 12, hergestellt, der auch Auskunft über Filter und Apparate gibt. — 4a) *R. Zsigmondy* und *G. Jander*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **58**, 241 bis 280, 1919; zitiert im Chem. Centralbl. **1919**, IV, 889. — 4b) *W. Bachmann*, Vortrag auf d. Tagung d. Ver. D. Chemiker zu Würzburg (1919); Chem.-Ztg. **110**, 595, 1919; Zeitschr. f. angew. Chem. **32**, 616, 1919. — 4c) *G. Jander* und *H. C. Stuhlmann*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **60**, 289 bis 321, 1921; zitiert im Chem. Centralbl. **1921**, IV, 1255 bis 1256. Dissertation von *H. C. Stuhlmann*, Göttingen 1921. — 4d) *G. Jander*, Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 269, 1922; zitiert im Chem. Centralbl. **1922**, IV, 297. — 4e) *Derselbe*, Habilitationsschrift, Göttingen 1921. Zeitschr. f. analyt. Chem. **61**, 145 bis 171, 1922; zitiert im Chem. Centralbl. **1922**, IV, 1. — 4f) *Derselbe*, Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, Nr. 103 vom 26. Dezember 1922, S. 721. — 4g) *H. C. Stuhlmann*, Jahrb. d. philosophischen Fakultät in Göttingen; Nr. 17, S. 70 bis 72. — 4h) *W. Bachmann*, Kolloidchem. Untersuchungsmethoden *Lunge-Berl*, „Chem.-techn. Untersuchungsmethoden“ **3**, 1292 (Berlin bei Springer 1923); vgl. auch **1**, 38, 1921. — 4i) *Houben-Weyl*, Die Methoden d. organ. Chem. **1**, 451 bis 455, 1921. — 4k) *K. Schorlemmer*, Kollegium Nr. 586, 1. Februar 1919, S. 46 bis 51; zitiert im Chem. Centralbl. **1919**, IV, 1; Mitt. aus d. Lab. d. Firma *Jucker & Co.* Chem. Fabrik, Haltingen in Baden. — 4l) *E. Jänicke*, 2. Aufl., Sammlung *Ferd. Fischer*, Chem. Technol. (Spamer). — 4m) Dr. *Harry Schmidt*, Altona a. d. Elbe, Techn. Rundschau (Berliner Tagebl.) **26**, 101 bis 102 (Nr. 15 vom 7. Juli 1920). — 4o) *G. Jander*, Die chemische Analyse unter Verwendung von Membranfiltern. Handb. d. Arbeitsmethod. in d. anorgan. Chem. von *Stähler*, **2**, 2. Hälfte, S. 923, 1925. — 4p) *G. Jander* und *Wilh. Jander*, IV. Mitt., Zeitschr. f. analyt. Chem. **63**, 273 bis 288, 1923. — 4q) *H. Maas*, Beiträge zur Kenntnis der Membranfilter und ihrer Verwendbarkeit in der analyt. Chemie. Inaug.-Diss., Göttingen 1922. — 5a) *Ficker*, Med. Klin. 1917, Nr. 45, S. 5. — 5b) *H. Citron*, Deutsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 12, S. 322 bis 323; zitiert im Chem. Centralbl. **1918**, II, 654. — 5c) *E. Eichhoff*, Centralbl. f. Bakt., Parasitenkunde und Infektionskrankh., I. Abt., **86**, Heft 7/3, S. 599 bis 606; zitiert im Chem. Centralbl. **1921**, IV, 850. — 5d) *P. H. Prausnitz* (Jena), Kolloid-Zeitschr. **29**, 293 bis 309, 1921; zitiert im Chem. Centralbl. **1922**, I, 843. — 5e) *H. Meyeringh*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 116 bis 136, 1922; zitiert in der Klin. Wochenschr. — 5f) *E. Mellin*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **40**, 21, 1922. — 5g) *G. Wiegner*, Mitt. f. Lebensmittelunters. u. Hyg. **12**, 263 bis 288, 1921. Ein kurzes Referat über den Artikel befindet sich im Chem. Centralbl. **1922**, II, 297. — 5h) *E. W. Schmidt*, Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. u. Infektionskrankh.,

II. Abt., 58, 464, 1923. — 5i) *Handovsky* und *Uhlenbruck*, Klin. Wochenschr., 4. Jahrg., Nr. 29. — 6a) *R. Zsigmondy* (mit Daten von Frl. *Beger* und Dr. *Joël*), Zeitschr. f. phys. Chem. **111**, H. 3/4, S. 222. — 6b) *E. Beger*, Inaug.-Diss. Göttingen 1923. — 7) *R. Zsigmondy*, Kolloidchem., 5. Aufl., 1925, Kap. 11, 24, 25. — 8a) *Müller von Blumencron*, Inaug.-Diss. Göttingen 1921. Zeitschr. d. Deutsch. Öl- u. Fettind. 1922, Nr. 10, S. 171. — 8b) *W. Prosch*, Inaug.-Diss. Göttingen 1922. Zeitschr. d. Deutsch. Öl- u. Fettind. 1922, Nr. 29, S. 450. — 8c) *W. Leeten*, Inaug.-Diss. Göttingen 1922. Zeitschr. d. Deutsch. Öl- u. Fettind. 1923, Nr. 4, S. 83. — 8d) *E. Kratz*, Inaug.-Diss. Göttingen 1923. Zeitschr. d. Deutsch. Öl- u. Fettind. 1924, Nr. 5, S. 50. — 9) *Wintgen* und *Löwenthal*, Kolloides Chromoxyd, Zeitschr. f. physik. Chem. **109**, 380. — 10) *B. Brukner* und *P. Uhlenbruck*, Zeitschr. f. Biol. **83**, 586 bis 592, 1925. — 11) *Brukner*, Inaug.-Diss. Göttingen 1925; noch ungedruckt. — 12a) *Brukner* und *Overbeck*, *Zsigmondy*-Festschrift, Ergänzungsband d. Kolloid-Zeitschr. **36**, 192, 1925. — 12b) *Thiessen*, diese Zeitschr. **140**, Heft 4/6, S. 457, 1923. — 12c) *Overbeck*, Chem. Apparatur 1926. Alle Apparate sind bei der V. G. W. (Vereinigte Göttinger Werke) Göttingen vorrätig. — 13) *Duclanx* u. *Wollmann*, C. rend. de l'Acad. des sciences **152**, 1580—1583, 1911. — 14) Unveröffentlichte Untersuchungen meiner Schüler Dr. *Kratz*, Dr. *Carius* und *Kuhmichel* und *H. Behre* (von den Hannov. Gummiwerken „Excelsior“; vorläufige unveröffentlichte Mitteilung.)

Über das Verhalten des Harnquotienten C : N bei der Adrenalinglykosurie.

Von

Hideo Wada.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 20. Februar 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Aus *Grafes* (1) kritischer Zusammenstellung der Literatur geht hervor, daß sowohl im Tierversuch (Kaninchen und Hund), wie auch im Versuch am gesunden und kranken Menschen Adrenalininjektionen, die gewöhnlich subkutan vorgenommen wurden, eine Steigerung des Gesamtumsatzes, also eine Vermehrung des O_2-Verbrauchs herbeiführen. Das gilt sowohl für den Versuch am nüchternen Tiere, wie für den Versuch am Tiere nach vorangegangener Zuckerfütterung. *Arnoldi* und *Leschke* (2) zeigten dazu beim Menschen, daß oft eine lange Nachwirkung der Adrenalinwirkung besteht, und daß je nach dem Ernährungszustand die Wirkung verschieden ausfällt. Der respiratorische Quotient ist von den verschiedenen Autoren bald mehr, bald weniger erhöht oder unbeeinflußt gefunden worden, meist aber war wohl eine Erhöhung vorhanden. Gerade bei chronischer Adrenalinvergiftung sah *Juschtschenko* (3), daß die Zunahme beim respiratorischen Gaswechsel vor allem die CO_2-Produktion, weniger den O_2-Verbrauch betraf, so daß der respiratorische Quotient erheblich anstieg. Allgemein gilt aber, daß bei der Adrenalininjektion die besprochene Gaswechselwirkung, nämlich die Erhöhung der CO_2-Produktion, die viel geringere Steigerung des O_2-Verbrauchs und vor allem die Steigerung des respiratorischen Quotienten $CO_2 : O$ sofort nach der Injektion einsetzt, rasch abklingt und dann sogar erniedrigten Werten mitunter Platz machen kann. Bei allem sind die Steigerungen der zirkulatorischen, respiratorischen (Steigerungen des Atemvolumens) und nervösen Faktoren zu berücksichtigen.

Die erhöhte Zuckermobilisation bzw. der erhöhte Blutzucker ist wohl ohne wesentliche Bedeutung für die Oxydationssteigerung. Dagegen ist eine vermehrte Kohlehydratverbrennung an der Erhöhung des respiratorischen Quotienten schuld, wenn man auch mit *Bornstein* (4) an eine vermehrte Abdunstung präformierter CO_2 in den Lungen denken muß.

Die N-Ausscheidung wurde beim Hunde, Kaninchen, und zwar gerade beim gesättigten Kaninchen vermehrt gefunden, aber es wurde auch von manchen Autoren eine Steigerung des Eiweißumsatzes vermißt. Je besser die Tiere aber im allgemeinen ernährt waren, so folgert *Grafe* (1) aus den vorliegenden Beobachtungen, um so deutlicher war die Steigerung des respiratorischen Quotienten, und um so geringer die Änderung am Eiweißstoffwechsel, je schlechter sie ernährt waren, und um so mehr sie hungerten, um so geringer war die Steigerung des respiratorischen Quotienten, und um so deutlicher die Steigerung des Eiweißumsatzes.

Im Hinblick auf meine Versuche, die sämtlich an gut genährten Kaninchen ausgeführt wurden, kann man also aus dem in der Literatur vorliegenden Beobachtungsmaterial folgern, daß als direkte und akute Wirkung bei der Adrenalininjektion eine Steigerung der Verbrennung (O_2-Verbrauch) eintritt, wobei wohl vor allem das Kohlehydrat im Hinblick auf die Erhöhung des respiratorischen Quotienten das Brennmaterial liefert.

Bei dieser Steigerung der Kohlehydratoxydation unter dem Einfluß des Adrenalins war die Frage berechtigt, ob bei dem größeren Umsatz von Kohlehydrat eine entsprechend vollständige Oxydation der gesamten umgesetzten Masse vorhanden wäre, oder ob dabei dysoxydative Störungen am Kohlehydrat in dem Sinne mit unterliefen, daß ein Teil des Kohlehydrats etwa einem partiellen Abbau anheimfiele, der dann als dysoxydabler Kohlenstoff im Harn neben dem Zucker aufträte. Schien doch die Adrenalinglykosurie darauf hinzudeuten, daß der Körper trotz gleichzeitiger Steigerung der Zuckeroxydation der stürmisch mobilisierten und ins Blut abströmenden Zuckermasse nicht Herr wird, und daß deshalb der Schwellenwert für die Zuckerzurückhaltung in der Niere überschritten wird, und der Zucker im Harn erscheint. So war es auch denkbar, daß Kohlenstoffverbindungen, die partiell abgebauten Zucker darstellten, neben der Glykose im Harn auftreten könnten, und zwar in einer pathologisch gesteigerten Menge, wie es von *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (5) und später von mir selbst (7) beim menschlichen Diabetes nachgewiesen ist, und wie *Kanamori* (6) es auch gelegentlich beim Phlorrhizindiabetes des Hundes gefunden hat. Beim Phlorrhizindiabetes liegen die Oxydationsverhältnisse insofern anders als bei der Adrenalinglykosurie, als dort das Zuckerverbrennungsvermögen in höchstem Grade eingeschränkt ist, während bei der Adrenalinvergiftung der Zucker in gesteigertem Umfange ver-

brannt wird. Ob nun bei der Adrenalinglykosurie dysoxydative Störungen am Zucker trotzdem mit unterlaufen oder nicht, konnte nur durch den Versuch entschieden werden.

Ich habe diese Frage am Kaninchen geprüft.

Die Tiere wurden bei gleichem Futter (Futterrüben) gehalten, und es wurde in einer Vorperiode der N- und C-Gehalt in der 24stündigen Harnmenge täglich ermittelt, und auf diese Weise wurden Durchschnittswerte hierfür wie auch für den Quotienten C : N in der Norm erhalten. Alsdann bekamen die Tiere mehrere Tage hindurch subkutane Adrenalininjektionen. Nunmehr wurden in der 24stündigen Harnmenge der gesamte C und N und außerdem der Zucker titrimetrisch bestimmt. Der Zuckerkohlenstoff wurde berechnet und von dem Gesamt-C des Harns abgezogen, und dann wurde mit diesem Rest-C und dem Gesamt-N der Quotient C : N (Restquotient) ermittelt. In der Nachperiode, die mit dem Aufhören der Adrenalinglykosurie begann und in der keine Adrenalininjektionen gemacht wurden, wurde wie in der Vorperiode der Quotient C : N aus dem totalen C des Harns festgestellt.

Auf das Verhalten dieses *Rest*quotienten kommt es an. Dieser ist beim menschlichen Diabetes vielfach pathologisch erhöht; beim Phlorrhizindiabetes ist er nur ausnahmsweise erhöht. ***Es kommt auf die Höhe dieses Restquotienten an im Vergleich zu der Höhe des Gesamtquotienten in der Vorperiode, und es kommt auf das Verhalten des Gesamtquotienten in der Nachperiode im Vergleich zu demjenigen des Gesamtquotienten in der Vorperiode an.***

Da nun der Kaninchenharn deutlich alkalische Reaktion hat und eine bakterielle Zerstörung von Zucker beim Sammeln des Harns während 24 Stunden möglich ist, wie ich (8) in einer anderen Mitteilung nachwies, wurde bei meinen Versuchen der Harn in einem Gefäß aufgefangen, das in einer Kältemischung stand, so daß der Harn nach seinem Eintritt in das Gefäß rasch zu Eisklumpen gefror. Dieser Harneisklumpen wurde dann am Ende der 24stündigen Periode aufgetaut und zur Analyse verwandt.

Aus meinen Versuchen teile ich zwei mit, die in jeder Beziehung tadellos durchgeführt sind. Ich stelle in der folgenden Tabelle I die

Tabelle I.

	Kaninchen 3			Kaninchen 4		
	C pro Tag g	N pro Tag g	C : N pro Tag g	C pro Tag g	N pro Tag g	C : N pro Tag g
Vorperiode . .	1,0882	0,7662	1,429	1,1156	0,7872	1,402
Hauptperiode .	1,1734	0,9078	1,292	0,9389	0,7187	1,306
Nachperiode .	1,1105	0,8372	1,322	1,0709	0,8008	1,373

Die C- bzw. C : N-Werte in der Hauptperiode bedeuten immer Rest-C bzw. Rest-C : N-Werte.

Datum	Körper-gewicht	Harn	Gesamt-C	Gesamt-N	Gesamt-C / Gesamt-N	(Mittel)	Ges. Zucker Titr.	Ges. Zucker-C Titr.	Rest-C Titr.	Rest-C (Titr.) / Ges.-N	(Mittel)	Bemerkungen
1. XII.	1900	360	1,3824	0,8568	1,6101		—	—	—	—		
2. XII.	—	395	1,1569	0,7737	1,495		—	—	—	—		
3. XII.	1920	435	1,0736	0,9744	1,101		—	—	—	—		
4. XII.	1850	320	0,8368	0,6272	1,334	1,429	—	—	—	—		
5. XII.	1750	410	1,1024	0,6888	1,600		—	—	—	—		
6. XII.	1850	324	0,9506	0,7258	1,309		—	—	—	—		
7. XII.	1800	256	1,1148	0,7168	1,555		—	—	—	—		
8. XII.	1750	233	1,2833	0,5872	2,185		0,9194	0,3677	0,9163	1,561		
9. XII.	1820	310	1,4991	0,7812	1,919		0,8463	0,3385	1,1606	1,485		
10. XII.	1850	360	1,9702	0,9072	2,160	1,8428	1,872	0,7488	1,2214	1,345	1,292	Adrenalin 0,5 ccm 2 mal täglich injiziert
11. XII.	1850	330	1,6414	1,0164	1,614		1,353	0,5412	1,1004	1,082		
12. XII.	1820	405	1,6675	1,2474	1,336		0,4982	0,19928	1,4683	1,177		
13. XII.	1820	285	1,0009	0,7980	1,254		—	—	—	—		
14. XII.	1870	230	1,0136	0,7728	1,312	1,322	—	—	—	—		
15. XII.	1850	420	1,3172	0,9408	1,400		—	—	—	—		

Tabelle III. Kaninchen 4.

Datum	Körper-gewicht	Harn	Gesamt-C	Gesamt-N	Gesamt-C / Gesamt-N	(Mittel)	Ges. Zucker Titr.	Ges. Zucker-C Titr.	Rest-C Titr.	Rest-C (Titr.) / Ges.-N	(Mittel)	Bemerkungen
16. XII.	2220	360	1,1275	0,7056	1,596		—	—	—	—		
17. XII.	2200	420	1,4683	0,9408	1,5607	1,4022	—	—	—	—		
18. XII.	2200	365	0,7511	0,7154	1,0500		—	—	—	—		
19. XII.	2150	460	3,5528	0,9016	3,9406		5,68739	2,27496	1,2779	1,4174		Adrenalin 0,5 ccm 2 mal täglich injiziert
20. XII.	2120	330	1,3860	0,7412	1,8699	3,939	1,17239	0,46895	0,9171	1,2373	1,306	
21. XII.	2100	320	3,0667	0,4480	6,8453		6,65205	2,66082	0,4158	0,9283		
22. XII.	2120	400	2,4305	0,7840	3,1002		3,2134	1,28536	1,1451	1,4606		
23. XII.	2150	400	0,9588	0,8960	1,0700	1,3734	—	—	—	—		
24. XII.	2100	420	1,1831	0,7056	1,6768		—	—	—	—		

Versuchsergebnisse zusammen. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß unter Nichtberücksichtigung des im Traubenzucker enthaltenen C in den glykosurischen Perioden bei dem Versuch 3 unter der Adrenalinwirkung im Tagesdurchschnitt die C- und N-Ausscheidung im Harn in der Hauptperiode etwas zunahmen, während sie im Versuch 4 etwas abnahmen; das stimmt mit den Resultaten der Versuche anderer Beobachter überein, soweit die N-Ausscheidung in Frage kommt, wie

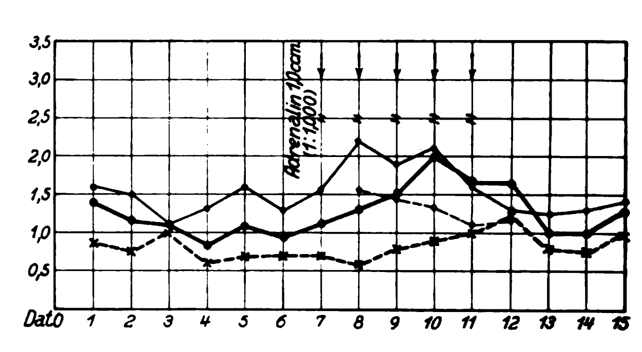
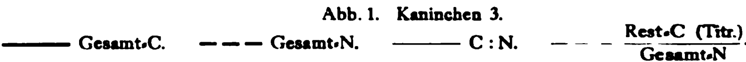


Abb. 1. Kaninchen 3.



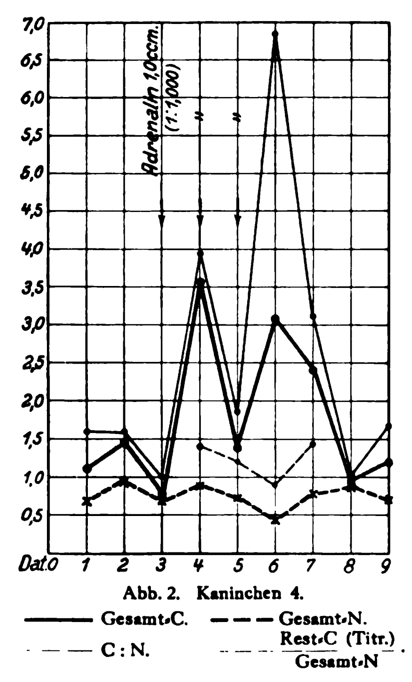


Abb. 2. Kaninchen 4.

Gesamt-C. Gesamt-N. C : N. $\frac{\text{Rest-C (Titr.)}}{\text{Gesamt-N}}$.

ich in der Einleitung auseinandergesetzt habe. Die C-Ausscheidung war bisher nicht untersucht worden. In beiden Versuchen aber hatte sich unter der Adrenalinwirkung der nicht im Zucker enthaltene dysoxydable Kohlenstoff des Harns im Vergleich zum Stickstoff etwas vermindert, und infolgedessen war in beiden Fällen der Quotient C : N oder, besser gesagt, der Restquotient unter der Adrenalineinwirkung herabgegangen. Die Senkung des Quotienten beträgt etwa 0,1. Das ist nicht viel, aber es beweist doch jedenfalls, daß durch das Adrenalin dysoxydative Störungen nicht erzeugt werden, sondern daß eher die Verbrennung des Kohlenstoffs vollständiger wird.

Ergebnis.

Aus meinen Versuchen geht hervor, daß es bei der Adrenalinglucosurie im Gegensatz zum menschlichen Diabetes und auch zu manchen Fällen von Phlorrhizinglykosurie nicht zu einer gesteigerten Ausscheidung von dysoxydablem Kohlenstoff im Vergleich zum Stickstoff durch den Harn neben dem Traubenzucker kommt.

Experimenteller Teil.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl*, der Kohlenstoff nach der in der Arbeit von *Gomez* (9) beschriebenen Methode, der Zucker nach *Bertrand* bestimmt.

Literatur.

1) *Grafe*, Die pathologische Physiologie des Gesamt-Kraft- und -Stoffwechsels bei der Ernährung des Menschen. Verlag Bergmann 1923. — 2) *Arnoldy* und *Leschke*, Zeitschr. f. klin. Med. **92**, 1921. — 3) *Juschtschenko*, diese Zeitschr. **15**, 1909. — 4) *Bornstein*, ebendaselbst **114**, 157, 1921. — 5) *Bickel* und *Kauffmann-Cosla*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 28; Virchows Arch. **259**, 1926. — 6) *Kanamori*, diese Zeitschr. **170**, 410, 1926. — 7) *Wada*, Nach dem Manuskript zitiert. — 8) *Derselbe*, ebendaselbst. — 9) *Gomez*, diese Zeitschr. **167**, 1926.

Über Veränderungen des Restquotienten C : N im zuckerhaltigen alkalischen Harn infolge von Zersetzungsvorgängen.

Von

Hideo Wada.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 20. Februar 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei den Untersuchungen über das Verhalten des Harnquotienten C : N unter verschiedenen pathologischen Bedingungen, die im hiesigen Laboratorium in den letzten Monaten ausgeführt wurden, stießen wir auf folgende methodisch wichtige Frage. Es war bei den Arbeiten mit zuckerhaltigen Harnen oft erforderlich gewesen, den Harnquotienten C : N nach Abzug des nach der polarimetrischen oder titrimetrischen Methode ermittelten Zuckers und des daraus durch Rechnung gefundenen Zucker-C-Gehalts zu bestimmen. Wir bezeichnen diesen Quotienten als den Restquotienten. Diese Analysen mußten in der während 24 Stunden gesammelten Harnmenge gemacht werden. Wenn diese Analysen Wert haben sollten, dann mußte man sicher sein, daß in den 24 Stunden, während der Sammlung des Harns, der Zucker nicht zersetzt würde. Denn bei der Zersetzung des Zuckers — besonders kam hier eine Zersetzung unter der Mitwirkung von Bakterien in Frage — konnten aus dem Zucker C-haltige Substanzen gebildet werden, die nicht mehr reduzierten oder optisch aktiv waren, die aber den Restquotienten beeinflußten; es konnte auch ein Teil des Kohlenstoffs des zersetzten Zuckers in Substanz der Bakterienleiber bei der Vermehrung der Bakterien umgewandelt werden. Auch die aus zersetztem Zucker gebildete und in dem Harn absorbierte oder anderweitig gebundene Kohlensäure konnte den Restquotienten beeinflussen. Nur die aus dem

Harn entwichene Kohlensäure des zersetzten Zuckers wäre auf den Restquotienten ohne Einfluß geblieben.

Während nun der Harn des Menschen und auch derjenige des Hundes auch nach 24stündiger Sammlung gewöhnlich eine saure oder doch mindestens eine schwach saure Reaktion zeigen und hier eine bakterielle Zersetzung des Zuckers kaum in Frage kommt — *Watanabe* fand im hiesigen Laboratorium bei ad hoc angestellten Versuchen überdies die Richtigkeit dieser Annahme bestätigt —, war bei dem alkalischen Kaninchenharn die Möglichkeit gegeben, daß hier Zersetzungen des Zuckers und damit Beeinflussungen des Restquotienten vorkommen könnten. Daher habe ich diese Frage einer genauen experimentellen Prüfung unterzogen.

In meiner Arbeit über das Verhalten des Harnquotienten C : N bei der Adrenalinglykosurie habe ich gezeigt, daß der Restquotient des Harns in den glykosurischen Perioden nicht erhöht ist. Bei diesen Versuchen wurde der während 24 Stunden sich absondernde Harn in einem Gefäß aufgefangen, das in einer Kältemischung stand, so daß der jeweils abfließende Harn sofort gefror und eine bakterielle Zersetzung unmöglich wurde. Ich habe nun bei meiner vorliegenden Arbeit ebenfalls durch Adrenalinvergiftung glykosurischen Harn bei Kaninchen erzeugt und die Versuche ganz in derselben Weise angestellt wie die Versuche in meiner oben zitierten Arbeit, nur mit dem Unterschied, daß der Harn in einem Gefäß aufgefangen wurde, das nicht in einer Kältemischung stand, so daß also der Harn während 24 Stunden bei Zimmertemperatur von etwa 18° C gesammelt wurde. In der 24stündigen Harnmenge wurde der Zucker titrimetrisch nach *Bertrand* bestimmt und der Zucker-C-Wert daraus theoretisch berechnet. Gleichzeitig wurde der gesamte C-Gehalt des Harns nach der in der Arbeit von *Gomez* beschriebenen Methode ermittelt und der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Von diesem Gesamt-C-Wert wurde der Zucker-C-Wert abgezogen und der Rest-C durch den Gesamt-N dividiert, und so der Restquotient C : N bestimmt. In den aglykosurischen Perioden wurde der Quotient aus dem gesamten C- und N-Gehalt des Harns ermittelt.

Ich fand nun, daß der Restquotient im glykosurischen Harn im Vergleich zu dem Gesamtquotienten der Vorperiode und Nachperiode stärker erhöht war. Das war ebensowohl der Fall bei der Anwendung des Titrationswertes wie auch des Polarisationswertes für den Zucker.

Wenn ich aber die 24stündige Harnmenge bei Kaninchen oder auch bei demselben Kaninchen einige Wochen später in dem in der Kältemischung befindlichen Gefäß sammelte, dann war der Rest-

quotient in den Adrenalinperioden niemals erhöht, sondern, wie ich in meiner früheren Arbeit mitteilte, eher etwas erniedrigt.

	Versuch mit Eiskasten	Versuch ohne Eiskasten
Kaninchen Nr. 1.		
Quotient in Vorperiode	1,429	1 442
Restquotient in Adrenalinperiode	1,292	1,940
Quotient in Nachperiode	1,322	1,316
Kaninchen Nr. 2.		
Quotient in Vorperiode	1,402	1,546
Restquotient in Adrenalinperiode	1,306	2,490
Quotient in Nachperiode	1,373	1,620

Aus diesen Versuchen sieht man, eine wie starke Zuckerzersetzung und, damit Hand in Hand gehend, eine wie starke Erhöhung des Restquotienten auftritt, wenn man den zuckerhaltigen alkalischen Kaninchenharn nicht unter Eis sammelt. Ferner zeigt die gute Übereinstimmung der Werte in den Vor- und Nachperioden der beiden Versuche bei jedem Kaninchen, daß im nicht zuckerhaltigen Kaninchenharn durch das Sammeln des Harns bei Zimmertemperatur keine Veränderung in dem Quotienten zustande kommt. Ich bemerke noch, daß bei den Restquotientbestimmungen in der vorstehenden Tabelle die titrimetrische Methode der Zuckeranalyse benutzt wurde.

Ferner habe ich noch folgenden Versuch angestellt. Ich habe in einem Kaninchenharn, der keinen Zucker enthielt, den Quotienten ermittelt, darauf habe ich diesem Harn eine bestimmte Menge Traubenzucker zugesetzt und den Harn 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Darauf habe ich den Zucker in dem Harn titrimetrisch bestimmt, abermals den Gesamt-C-Gehalt des Harns analysiert und den theoretisch berechneten Zucker-C von dem Gesamt-C abgezogen und diesen Rest-C zur Quotientbestimmung benutzt. Auch in diesem Falle war der Restquotient in dem zuckerhaltigen Harn nach dem Stehen des Harns bei Zimmertemperatur erhöht. Das Versuchsprotokoll findet sich in folgender Tabelle.

Kaninchen. Quotient des Harns vor dem Zuckerzusatz: 1,35.

Harn	C	N	C : N	Zucker	Gesamt-Zucker	Gesamt-Zucker-C	Rest-C	Rest-C / Ges.-N	Bemerkungen
320	1,3696	0,6384	2,14	0,15	0,48	0,192	1,1776	1,84	Zum Harn 1,0 g Traubenzucker zugesetzt und nach 24 Stunden untersucht. Stehen bei Zimmertemperatur

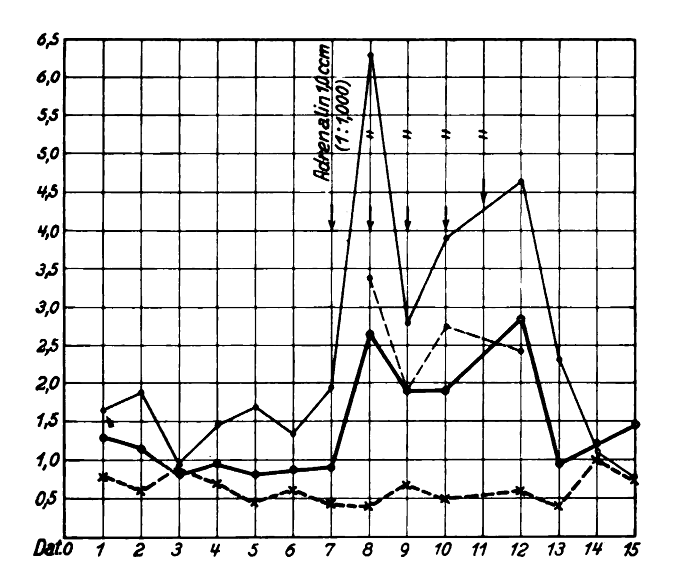


Abb. 1. Kaninchen 1.

——— Gesamt-C. — — — Gesamt-N.

——— C : N. — — — $\frac{\text{Rest-C (Titr.)}}{\text{Gesamt-N}}$.

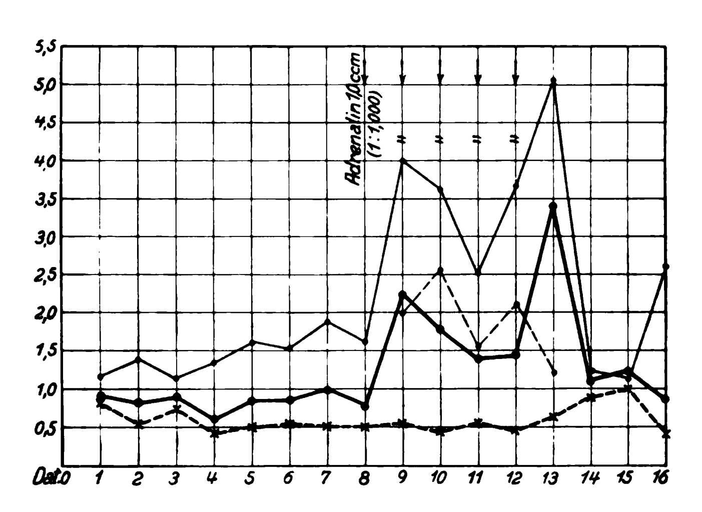


Abb. 2. Kaninchen 2.

——— Gesamt-C. — — — Gesamt-N.

——— C : N. — — — $\frac{\text{Rest-C (Titr.)}}{\text{Gesamt-N}}$.

Datum	Körpergewicht	Harn	Gesamt-C		Gesamt-N		Gesamt-C / Gesamt-N		Gesamt-Zucker Pol.	Ge… Zu… T…
8. XI.	2220	360	1,315	*0,9767*	0,8064	*0,6316*	1,63	1,57 (*1,546*)	—	—
9. XI.	2200	440	1,164		0,6160		1,89		—	—
10. XI.	2200	380	0,817		0,8512		0,96		—	—
11. XI.	2200	410	0,952		0,5740		1,48		—	—
12. XI.	2250	340	0,816		0,4760		1,71		—	—
13. XI.	2220	380	0,863		0,6384		1,35		—	—
14. XI.	2220	410	0,910		0,4592		1,97		—	—
15. XI.	2200	300	2,6499	*2,3397*	0,4200	*0,5541*	6,30	4,41 (*4,22*)	—	3,15
16. XI.	2170	410	1,9188		0,6888		2,78		1,3653	1,5[illegible]
17. XI.	2100	440	1,9294		0,4928		3,92		1,100	1,4[illegible]
18. XI.	2170	330	—		—		—		—	—
19. XI.	2150	440	2,8608		0,6160		4,64		3,300	3,41
20. XI.	2200	300	0,9792	*1,2312*	0,420	*0,7596*	2,33	1,809 (*1,620*)	—	—
21. XI.	2240	420	1,2390		1,117		1,109		—	—
22. XI.	2200	530	1,4755		0,742		1,988		—	—

Datum	Körpergewicht	Harn	Gesamt-C		Gesamt-N		Gesamt-C / Gesamt-N		Gesamt-Zucker Pol.	Ge… Zu… T…
22. X.	2050	400	0,916	*0,835*	0,784	*0,579*	1,16	1,465 (*1,442*)	—	—
23. X.	2150	325	0,772		0,546		1,41		—	—
24. X.	2180	385	0,907		0,755		1,17		—	—
25. X.	2100	310	0,585		0,434		1,34		—	—
26. X.	2050	250	0,857		0,525		1,62		—	—
27. X.	2100	289	0,862		0,566		1,56		—	—
28. X.	2130	380	0,998		0,532		1,87		—	—
29. X.	2100	350	0,783		0,490		1,59		—	—
30. X.	2050	330	2,2427	*2,0597*	0,554	*0,5393*	4,045	3,667 (*3,819*)	2,805	2,871
31. X.	2000	320	1,8021		0,448		3,58		1,536	1,646
1. XI.	2000	250	1,4000		0,560		2,50		1,25	1,35
2. XI.	1970	330	1,4600		0,462		3,16		0,858	1,23[illegible]
3. XI.	1920	400	3,394		0,672		5,05		5,64	5,60
4. XI.	2000	270	1,1165	*1,0487*	0,907	*0,7966*	1,236	1,472 (*1,316*)	—	—
5. XI.	2050	350	1,1872		1,078		1,101		—	—
6. XI.	2050	360	0,8424		0,403		2,089		—	—

…t-…C	Gesamt-Zucker-C Titr.	Rest-C Pol.	Rest-C Titr.	Rest-C (Pol.) / Gesamt-N	Rest-C (Titr.) / Gesamt-N		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	1,2600	—	1,3899	—	3,3930	2,49	Adrenalin 0,5 ccm zweimal täglich injiziert
…il	0,6233	1,3727	1,2955	1,9920	1,8808		
…10	0,5727	1,4894	1,3567	3,0223	2,7530		
	—	—	—	—	—		
…10	1,3620	1,5408	1,4988	2,5010	2,4330		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		

…t-…C	Gesamt-Zucker-C Titr.	Rest-C Pol.	Rest-C Titr.	Rest-C (Pol.) / Gesamt-N	Rest-C (Titr.) / Gesamt-N		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
	—	—	—	—	—		
…12	1,148	1,1207	1,1094	2,02	1,98	1,94	Adrenalin 0,5 ccm zweimal täglich injiziert
…14	0,659	1,1881	1,1431	2,65	2,55		
…00	0,540	0,9000	0,8600	1,60	1,54		
…13	0,495	1,1170	0,9650	2,50	2,09		
…56	2,240	1,1380	1,1540	1,69	1.71		
-	—	—	—	—	—		
-	—	—	—	—	—		
-	—	—	—	—	—		

Ergebnis.

Aus meinen Versuchen ergibt sich, daß im zuckerhaltigen, alkalischen Harn beim Stehenlassen des Harns bzw. beim Sammeln des Harns bei 24 stündiger Zimmertemperatur ein Teil des reduzierenden Zuckers in nicht reduzierende Kohlenstoffverbindungen übergeführt wird. Dadurch wird der Restquotient des Harns erhöht. Diese Fehlerquelle, an die man bei derartigen Untersuchungen beim alkalischen Harn stets denken muß, kann durch sofortiges Gefrierenlassen des Harns ausgeschaltet werden. Beim sauren Harn findet auch beim Aufbewahren des Harns bei Zimmertemperatur keine Zuckerzersetzung statt, wie *Kanamori* nachgewiesen hat.

Zum Nachweis des Bilirubins.

Von

Maximilian Sternberg.

(Aus der I. medizinischen Abteilung des Krankenhauses Wieden in Wien.)

(Eingegangen am 22. Februar 1926.)

Der Zufall stellte mich vor die Notwendigkeit, einen Harn ohne die üblichen Reagenzien auf Bilirubin zu untersuchen.

Die folgende Überlegung führte zur Lösung dieser Aufgabe: Das Bilirubin ist in Wasser unlöslich, im Harn als Bilirubinalkali gelöst. Zerlegt man diese Verbindung durch Zusatz einer schwachen Säure, so muß das unlösliche Bilirubin ausfallen. Setzt man aber gleichzeitig noch ein Oxydationsmittel und Alkohol zu, so entsteht Biliverdin, das sich in dem verdünnten Alkohol mit grüner Farbe lösen muß, da es in Alkohol ziemlich leicht löslich ist. Zufällig war Phosphorsäure, Alkohol und altes, verharztes Oleum juniperi vorhanden, das letztgenannte hatte einmal als Inhalationsmittel gedient. Mit diesen Reagenzien gelang in der Tat eine deutliche und überzeugende Probe beim Erwärmen.

Eine weit schönere und empfindlichere Reaktion erhält man, wenn man das als Notbehelf verwendete oxydierte ätherische Öl durch die käufliche Lösung von Wasserstoffsuperoxyd ersetzt.

Die Reaktion wird am zweckmäßigsten folgendermaßen angestellt: Man füllt die Kuppe der Eprouvette mit Phosphorsäure in offizineller Lösung, fügt 2 cm hoch Harn hinzu und die gleiche Menge von 96proz. Alkohol, dann ungefähr so viel H_2O_2-Lösung wie Phosphorsäure. Die Mischung wird über der Flamme vorsichtig erwärmt, ohne zu kochen. Bei Gegenwart von Bilirubin tritt eine schöne grasgrüne Färbung auf, die beim Stehen und Abkühlen noch an Intensität zunimmt. Bei längerem Kochen schreitet die Oxydation weiter und es entsteht bräunliche Entfärbung.

Die Empfindlichkeit dieser Reaktion ist ungefähr gleich der Empfindlichkeit der Jodtinkturprobe, wenn sie mit Überschichtung ausgeführt wird.

Die neue Reaktion hat ein gewisses theoretisches Interesse, indem sie die Richtigkeit der gebräuchlichen Annahmen über das Verhalten der Gallenfarbstoffe direkt bestätigt. Sie kann an Stelle der *Gmelin*schen Probe und ihrer Modifikationen verwendet werden und dürfte insofern auch Vorteile haben, als sie sehr einfach auszuführen ist und das Arbeiten mit Salpetersäure vermeidet, das im klinischen Laboratorium und noch mehr für den praktischen Arzt nicht eben bequem ist.

Über die Beeinflussung des Harnquotienten C:N durch Insulin beim normalen Kaninchen.

Von

Hideo Wada.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 22. Februar 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der Avitaminose, bei der der Kohlehydratstoffwechsel im Sinne einer Herabsetzung der Oxydation gestört ist, und zwar gewöhnlich, ohne daß es dabei zu einer Glykosurie kommt, kann nach den Beobachtungen von *Bickel* und *Collazo* (1) die Störung des Kohlehydratstoffwechsels durch Insulin unter anderem so weit reguliert werden, daß es wieder zu einem Glykogenansatz in der Leber kommt. Die Leber ist bei der Avitaminose fast glykogenfrei.

Ferner haben *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (2) bei der Avitaminose gefunden, daß durch Insulininjektion die bei dieser Krankheit vermehrte Ausscheidung von dysoxydablem Kohlenstoff zurückgeht, und zwar von Kohlenstoff, der nicht im Traubenzucker enthalten ist, und daß der bei dieser Krankheit erhöhte Quotient C : N durch Insulin gesenkt wird. Vielfach sank auch unter der Insulinwirkung bei diesen Versuchen die Stickstoffausscheidung, aber die wesentliche Wirkung durch Insulin zeigte sich doch an der Verminderung des dysoxydablen Kohlenstoffs. Ferner hat *Lili Rosenwald* (3) im hiesigen Laboratorium gefunden, daß auch die von ihr und gleichzeitig auch von *Collazo* im Institut für experimentelle Pathologie in Paris gefundene Steigerung der Milchsäureausscheidung durch den Harn bei der Avitaminose durch die Insulininjektion herabgedrückt werden kann. Allerdings tritt diese Verminderung der Milchsäureausscheidung erst am folgenden oder übernächsten Tage nach der Insulininjektion deutlich zutage.

Kauffmann-Cosla (2) hatte nun weiter gesehen, daß bei einem normalen Hunde, der mit Fleisch ernährt wurde, kein Einfluß des Insulins auf den Harnquotienten C : N nachweisbar war, wenn dem Tiere, das 6 kg wog, sechs Einheiten Insulin injiziert wurden.

Aus allen diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Insulininjektion nicht nur den in der Form der Dextrose durch den Harn zur

Ausscheidung gelangenden dysoxydablen Kohlenstoff, sondern auch andere Quoten dieses Kohlenstoffs zu vermindern vermag, wenn unter pathologischen Verhältnissen dieser Kohlenstoff vermehrt ist. Beim normalen Organismus aber scheint die Insulinwirkung auf den dysoxydablen Harnkohlenstoff anders zu sein. Der Versuch von *Kauffmann-Cosla* an einem normalen Tiere wurde am Hunde ausgeführt, der bei Fleischfütterung einen verhältnismäßig niedrigen Quotienten von 0,54 hatte. Man konnte denken, daß bei einem derartig niedrigen Quotienten eine Insulinzulage zum Körper deshalb ohne Wirkung war, weil der Körper intermediär bereits eine optimale Oxydation zeigte. Es war möglich, daß ein Körper, der in der Norm einen höheren Quotienten aufwies, bei dem also größere Mengen von dysoxydablem Kohlenstoff ausgeschieden wurden, sich anders verhielt bei der Insulininjektion. Das Kaninchen ist nun ein Tier, das in der Norm im Gegensatz zum Hunde einen sehr hohen Quotienten besitzt. Er liegt beim Kaninchen gewöhnlich zwischen 1,5 und 2,5.

Meine Versuchsanordnung war nun derart, daß ich bei Kaninchen, die unter täglich gleicher Fütterung mit Futterrüben gehalten wurden, den Quotienten bestimmte, den Stickstoff nach *Kjeldahl*, den Kohlenstoff nach der in der Arbeit von *Gomez* (4) angegebenen Methode. Es wurde zunächst in einer 1 bis 1 ½ Wochen dauernden Vorperiode im Harn täglich der Quotient bestimmt und der Mittelwert des Quotienten in dieser Vorperiode berechnet. In einer ebenso lange währenden oder auch länger dauernden Hauptperiode, in der die Tiere täglich Insulininjektionen bekamen, wurde ebenso verfahren, desgleichen in einer Nachperiode von ungefähr derselben Dauer, in der aber das Insulin wieder fortgelassen wurde. Bei einem Kaninchen habe ich die Versuchsanordnung noch etwas modifiziert. Ich habe dem Kaninchen neben dem Rübenfutter täglich eine bestimmte Menge Traubenzucker gegeben. Durch diese Traubenzuckergabe wird die Gesamtausscheidung des dysoxydablen Kohlenstoffs nicht verändert, es trat auch keine Glykosurie auf, aber die Gesamtstickstoffausscheidung sank infolge der eiweißsparenden Wirkung der Traubenzuckergabe auf ungefähr die Hälfte, so daß sich der Quotient verdoppelte. Nachdem dies erreicht war, wurden bei dauernder Traubenzuckerzufuhr nunmehr die Insulininjektionen gemacht und der Quotient weiter untersucht.

Ich teile zunächst das Ergebnis meiner Versuche mit. In einem Versuch, bei dem einem Kaninchen von 1800 g Körpergewicht täglich zwei Einheiten Insulin, und zwar eine vormittags und eine abends subkutan injiziert wurden, stieg der Quotient während der Insulininjektion von 1,79 in der Vorperiode auf 2,13 an und erhob sich in der insulinfreien Nachperiode weiter bis auf 3,43. Bei einem anderen Versuch, bei dem etwas größere Insulinmengen, zunächst täglich

zweimal eine Einheit, später täglich zweimal zwei Einheiten injiziert wurden, sank der Quotient von 2,12 in der Vorperiode auf 1,80 in der Insulinperiode, um nachher wieder in der insulinfreien Nachperiode auf 2,36 anzusteigen.

Bei diesen Versuchen war also bei der kleineren Dose der Quotient etwas gesteigert worden, bei der größeren Dosis Insulin aber leicht gesenkt worden. *Der Effekt der Insulininjektion auf den Quotienten beim normalen Kaninchen ist also sicherlich nicht einheitlich, aber ein Einfluß ist schon vorhanden.*

Bei dem Kaninchen mit der Traubenzuckerzulage stieg unter der Wirkung von vier Einheiten Insulin pro Tag der Quotient an, sank dann unter der Wirkung von sechs Einheiten täglich etwas unter den Wert der Vorperiode, in der Traubenzucker, aber kein Insulin gegeben wurde, und er erhob sich wieder über diesen Vorperiodenwert ein wenig, als acht Einheiten Insulin täglich gegeben wurden.

In der Nachperiode sank dann der Quotient wieder, erreichte aber auch, als mit der Traubenzuckerzufuhr aufgehört wurde, nicht mehr den Wert des ersten Teiles der Vorperiode, in dem noch kein Traubenzucker gegeben wurde, sondern blieb zwischen den Werten der beiden Abschnitte der Vorperiode. Es ist immerhin auffällig, daß bei allen diesen Versuchen nach dem Aussetzen des Insulins der Quotient erhöht war, während bei der Insulininjektion ohne Rücksicht auf die Dosis der Quotient bald erhöht, bald erniedrigt war. Gerade die Beobachtungen an dem Kaninchen mit Zuckerzulage zur Nahrung zeigen, daß die Quotientänderungen, sowohl die durch die Zuckerzulage allein hervorgerufenen, wie auch die durch das Insulin bewirkten in erster Linie durch die Änderungen in der Stickstoffausscheidung herbeigeführt werden. Bei der Gabe von vier Einheiten Insulin wurde eine stärkere Stickstoffersparung erzielt, bei der Gabe von sechs und acht Einheiten Insulin aber war die Stickstoffausscheidung gesteigert und ließ auch in der Nachperiode, solange Zucker gegeben wurde, eine Steigerung erkennen im Vergleich zu dem Abschnitt in der Vorperiode, in dem das Tier Zucker bekam.

Bei dem Kaninchen 1 war ebenfalls die Kohlenstoffausscheidung in allen Perioden durchschnittlich die gleiche, und die Quotientänderungen kamen vor allem durch Veränderungen in der Stickstoffausfuhr zustande, die sich unter der Insulinwirkung hob. Bei dem Kaninchen 2 war die Kohlenstoffausscheidung in der Vorperiode und in der Insulinperiode ungefähr dieselbe, aber die Stickstoffausscheidung war in der Insulinperiode vermindert. In der Nachperiode erhöhte sich aber die Kohlenstoffausscheidung beträchtlich, während die Stickstoffausscheidung nur den Wert der Vorperiode wieder erreichte.

Tabelle I. Kaninchen Nr. 1.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Gesamt-C g		Gesamt-N g		C : N		Bemerkungen
8. VIII.	1960	300	1,800	0,9933	0,840	0,4722	2,140	2,118	
9. VIII.	1920	200	0,364		0,336		1,080		
0. VIII.	—	400	1,136		0,560		2,030		
1. VIII.	1980	260	0,726		0,364		1,990		
1. IX.	1985	300	0,906		0,284		3,190		
2. IX.	—	—	—		—		—		
3. IX.	2000	229	1,028		0,449		2,280		
4. IX.	—	—	—		—		—		
5. IX.	2000	385	0,457	0,9887	0,539	0,5517	0,847	1,805	1 Einheit Insulin täglich zweimal
6. IX.	2000	350	0,757		0,396		1,911		
7. IX.	2000	310	0,827		0,356		2,323		
8. IX.	1950	362	—		—		—		2 Einheiten Insulin täglich zweimal
9. IX.	2000	520	1,239		0,728		1,701		
10. IX.	2050	360	0,942		0,605		1,557		
11. IX.	2100	350	1,710		0,686		2,492		
12. IX.	2100	525	1,487	1,0076	0,500	0,4473	2,972	2,365	
13. IX.	2150	220	0,951		0,399		2,383		
14. IX.	2200	650	1,998		0,930		2,148		
15. IX.	2150	160	0,561		0,268		2,093		
16. IX.	2250	209	0,554		0,501		1,105		
17. IX.	2300	260	0,503		0,291		1,728		
18. IX.	2300	216	0,999		0,242		4,128		

Tabelle II. Kaninchen Nr. 2.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Gesamt-C g		Gesamt-N g		C : N		Bemerkungen
16. IX.	1800	105	0,299	0,8516	0,560	0,4691	0,534	1,791	
17. IX.	1800	120	0,282		0,268		1,052		
18. IX.	1800	130	0,570		0,249		2,289		
19. IX.	1750	140	0,574		0,352		1,630		
20. IX.	—	475	1,592		0,532		2,992		
21. IX.	1900	270	0,321		0,504		0,637		
22. IX.	1800	496	1,427		0,577		2,473		
23. IX.	1700	400	1,178		0,524		2,248		
24. IX.	1700	470	1,422		0,656		2,167		1 Einheit Insulin täglich zweimal
25. IX.	1750	371	0,491	0,8654	0,189	0,4268	2,597	2,128	
26. IX.	—	422	0,450		0,177		2,542		
27. IX.	1800	310	0,882		0,434		2,032		
28. IX.	1800	274	0,847		0,537		1,577		
29. IX.	1750	315	0,893		0,529		1,688		
30. IX.	1700	310	1,414		0,547		2,585		
1. X.	1800	268	1,081		0,575		1,880		
2. X.	1800	349	1,290	1,504	0,583	0,4523	2,212	3,434	
3. X.	1850	409	1,508		0,458		3,292		
4. X.	1850	280	0,934		0,313		2,984		
5. X.	1850	410	1,655		0,574		2,883		
6. X.	1850	420	1,722		0,471		3,656		
7. X.	1850	441	1,873		0,446		4,199		
8. X.	1850	287	1,546		0,321		4,816		

Tabelle III. Kaninchen Nr. 3.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Gesamt-C g	Mittel	Gesamt-N g	Mittel	C:N	Mittel	Bemerkungen
6. I.	2250	450	1,384 34	1,107 29	1,0080	0,8809	1,3734	1,292 08	
7. I.	2200	530	1,065 30		1,0388		1,0255		
8. I.	2150	445	1,229 00		1,1214		1,0959		
9. I.	2150	400	1,060 00		0,6720		1,5803		
10. I.	2200	460	1,004 87		0,6440		1,5603		
11. I.	2200	440	0,981 59		0,7192		1,3648		
12. I.	2170	430	1,025 98		0,9632		1,0444		
13. I.	2200	550	1,111 49	1,096 59	0,4620	0,4737	2,4058	2,326 34	Traubenzucker 3,0 g pro Kilogramm mit 30 ccm destillierten Wasser (per os)
14. I.	2200	370	0,766 90		0,4144		1,8513		
15. I.	2200	530	1,447 96		0,4452		3,2523		
16. I.	2200	435	1,016 60		0,4872		2,0866		
17. I.	2200	500	1,140 00		0,5600		2,0357		
18. I.	2270	355	1,272 18	1,183 99	0,3976	0,3764	3,1996	2,9096	4 Einheiten Insulin mit Traubenzucker wie oben
19. I.	2200	545	1,160 85		0,4578		2,5357		
20. I.	2170	445	1,118 95		0,3738		2,9934		
21. I.	2200	450	1,065 15	1,026 22	0,5040	0,5678	2,1133	1,8589	6 Einheiten Insulin mit Traubenzucker wie oben
22. I.	2200	500	1,209 50		0,7700		1,5707		
23. I.	2200	455	0,951 77		0,5096		1,8676		
24. I.	2200	490	0,957 95		0,6860		1,3964		
25. I.	2200	430	1,091 77		0,5418		2,0132		
26. I.	2200	370	0,837 53		0,4144		2,0210		
27. I.	2200	420	0,978 18		0,6468		1,5123		
28. I.	2250	480	1,117 92		0,4704		2,3765		
29. I.	2250	460	1,144 02	1,264 72	0,5152	0,5026	2,2205	2,5217	8 Einheiten Insulin mit Traubenzucker wie oben
30. I.	2200	510	1,418 82		0,5712		2,4838		
31. I.	2220	440	1,317 36		0,4928		2,6305		
1. II.	2200	440	1,186 68		0,4312		2,7520		
2. II.	2250	450	1,092 15	1,119 05	0,7560	0,6232	1,4446	1,8396	
3. II.	2220	420	1,131 48		0,5780		1,9575		
4. II.	2200	425	1,133 52		0,5355		2,1167		
5. II.	2200	400	1,162 80	1,167 65	0,5040	0,5824	2,3071	2,0482	Ohne Traubenzucker
6. II.	2250	460	1,131 60		0,5152		2,1964		
7. II.	2250	390	1,110 40		0,5460		2,0337		
8. II.	2250	455	1,265 81		0,7644		1,6559		

Es ist bemerkenswert, daß das Insulin beim normalen Organismus die Ausscheidung des dysoxydablen Kohlenstoffs in seinen absoluten Mengen durch den Harn praktisch fast gar nicht beeinflußt. Bei den drei Kaninchen war nur in einem Falle, und zwar bei dem Kaninchen 2 auch nur in der Nachperiode die Ausscheidung des dysoxydablen Kohlenstoffs deutlich vermehrt. Eine Verminderung des dysoxydablen Kohlenstoffs wurde in keinem Falle unter der Insulinwirkung beobachtet. Im Gegensatz dazu ruft das Insulin bei Krankheitszuständen mit Oxydationsstörungen am Kohlenstoff, bei denen also der dysoxydable Harnkohlenstoff vermehrt ist, eine Senkung desselben hervor, indem es die Oxydation am intermediären Kohlehydrat-

stoffwechsel verbessert. Das gilt sowohl für den Zucker, wie auch für andere Quoten des vermehrten dysoxydablen Harnkohlenstoffs. Beim normalen Körper beeinflußt das Insulin im Gegensatz zu dem oben geschilderten kranken Körper in erster Linie den Stickstoffumsatz. Dieser kann bald erhöht, bald gesenkt werden. Auch bei dem kranken Körper wird der Stickstoffumsatz durch Insulin beeinflußt, aber im Mittelpunkt der Erscheinung steht hier doch jedenfalls die Wirkung auf den Kohlehydratumsatz.

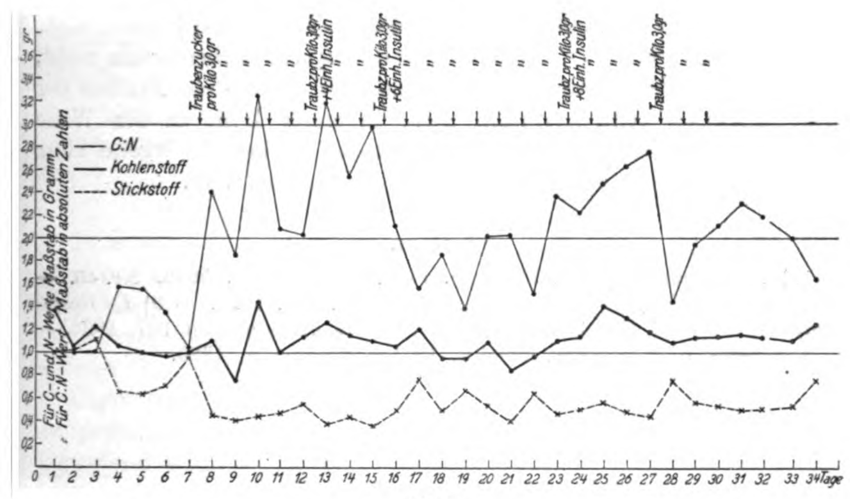


Abb. 1.

Aus meinen Versuchen geht also nun hervor, daß der dysoxydable Kohlenstoff in bezug auf seine absoluten Mengen im Harn in der Norm durch Insulin nicht verändert wird. Außer den hier besprochenen Versuchen habe ich noch einige andere Versuche an Kaninchen und Hunden in derselben Richtung unternommen, die aber kein anderes Resultat hatten als die hier mitgeteilten.

Aus der Zusammenstellung der Literatur über die Insulinwirkung von *Grevenstuk* und *Laqueur* (5) geht hervor, daß beim gesunden Kaninchen die Insulininjektion zunächst etwa in der ersten halben Stunde den Gaswechsel unverändert läßt, daß dann aber bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch der respiratorische Quotient etwas ansteigt. Beim gesunden Menschen wird der Grundsatz durch Insulin überhaupt nicht, der respiratorische Quotient nur ausnahmsweise im Sinne einer Erhöhung verändert. Es ist schwer, heute schon ein endgültiges Urteil über die Wirkung des Insulins auf den Gaswechsel beim normalen Körper abzugeben. Denn die vorliegenden Versuche haben nicht immer eindeutige Resultate gegeben. Es scheint aber doch nach den besten der vorliegenden Versuche die Sache so zu sein, daß durch die Insulininjektion beim normalen Tier der Grundumsatz nicht verändert wird und der respiratorische Quotient entweder

unverändert bleibt oder eine geringe Steigerung erkennen läßt. Das alles gilt natürlich nur für den Fall, daß durch die Insulinwirkung nur die Blutzuckersenkung, aber nicht die übrigen toxischen Wirkungen, die sogenannten hypoglykämischen Krämpfe hervorgerufen werden.

Da nun auch bei meinen Versuchen sich keine Veränderungen in einer ganz bestimmten Richtung, insbesondere keine Herabsetzung in der Menge des dysoxydablen Harnkohlenstoffs in der Norm ergeben haben, folgt auch daraus in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gaswechseluntersuchung, daß gröbere Veränderungen in der Oxydation beim normalen Körper durch die Insulininjektion nicht hervorgerufen werden. *Grevenstuk* und *Laqueur* haben ganz recht, wenn sie das Verschwinden des Blutzuckers unter dem Einfluß der Insulininjektion beim normalen Tiere in erster Linie in der Weise deuten, daß durch eine Bindung des freien Zuckers in irgend einer Form der Reduktionswert des Blutes herabgesetzt wird.

Literatur.

1) *Bickel* und *Collazo*, Deutsch. med. Wochenschr. **1923**, Nr. 45. — 2) *Bickel* und *Kauffmann-Cosla*, diese Zeitschr. **166**, 1925. — 3) *L. Rosenwald*, ebendaselbst **168**, 324, 1926. — 4) *Gomez*, ebendaselbst **167**, 1926. — 5) *Grevenstuk* und *Laqueur*, Insulin, Verlag Bergmann, 1925.

Über Fettspaltvermögen und Cholesteringehalt im Blutserum bei Luetikern.

Von

H. v. Weiss und **M. Dörle.**

(Aus der medizinischen Universitäts-Poliklinik, Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 27. Februar 1926.)

In unseren Untersuchungen über das Fettspaltvermögen im Blutserum von Hypertonikern und Arteriosklerotikern (*Dörle* und *v. Weiss*, 1926) konnten wir einen Zusammenhang zwischen herabgesetztem Fettspaltvermögen und Hypercholesterinämie feststellen. Herabgesetztes Fettspaltvermögen ergab sich bei einigen unter unserem damaligen Material befindlichen Fällen von Lues und Metalues. Eine Nachprüfung dieser letzteren Beobachtung an größerem Material ist Gegenstand vorliegender Untersuchungen.

Über herabgesetztes Fettspaltvermögen bei zwei Fällen von Lues berichtete erstmalig *Bauer* 1912. Über erhöhten Cholesteringehalt im Serum Luetischer finden sich mehrfach Angaben in der Literatur. So fanden *Klein* und *Dinkin* 1914 bei zwei Dritteln ihrer Fälle eine deutliche Cholesterinvermehrung im Durchschnitt auf 239 mg in 100 ccm Serum. Ähnliche Befunde erhoben *Stein* 1914, *Pribram* 1914 und *Jakobi* 1915 insbesondere bei Metalues. Der Einfluß des Cholesterinspiegels auf den Ausfall der Wassermannreaktion im Blutserum wurde von verschiedenen Autoren geprüft, so von *Carbone* und *Nizzi* 1913 und 1914, die durch Zusatz von Cholesterinlösungen den Ausfall der Wassermannreaktion von negativ in positiv verwandeln konnten. Sie hielten die bei der Wassermannreaktion wirksame Substanz für Cholesterin und fanden dieses bei der Ausfällung zu vier Fünfteln an die Globulinfraktion gebunden. Auch *Berczeller* und *Schillinger* fanden 1918, daß zum Zustandekommen der Wassermannreaktion Lipoide und eiweißartige Bestandteile nötig sind.

Unsere Methodik war die auch bei den bisherigen Untersuchungen benutzte. Das Fettspaltvermögen wurde mit dem *Traube*schen Stalagmometer bestimmt; der auch beim Gesunden ziemlich wechselnde Wert ist im Durchschnitt auf 5 bis 10 Tropfen anzunehmen. Der Cholesteringehalt wurde kolorimetrisch nach *Autenrieth* bestimmt. Der Durchschnittswert beim Gesunden beträgt hier etwa 120 bis 160 mg in 100 ccm Serum.

Für die Überlassung des größten Teils der von uns untersuchten Seren aus der serologischen Abteilung der Freiburger Hautklinik sind wir Herrn Professor Dr. *Rost* sehr zu Dank verpflichtet.

Unsere Untersuchungen umfaßten insgesamt 95 Patienten. Bei 56 bestand eine seropositive Lues, bei 23 eine klinisch sichere, jedoch seronegative Lues. Bei 16 Kontrollfällen bestand keine luetische Erkrankung.

Die Ergebnisse sind im einzelnen folgende:

I. Seronegative Lues (23 Fälle).

Tabelle I.

Nr.	Alter Jahre	Geschlecht	Fettspalt. vermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg	Bemerkungen
27	65	♂	$1^1/_2$	260	P. A. Spir. ++
28	30	♂	0	250	P. A. Spir. ++
30	35	♂	0	280	P. A. in Salv.-Kur
4	35	♂	4	128	Lu II, Ende 7. Salv.-Kur
5	25	♂	9	120	Lu II, Beginn 2. Kur
13	33	♂	$2^1/_2$	210	Lu II, lat.
26	34	♂	0	342	Lu lat., in 5 Jahren 4 Kuren
32	26	♂	0	290	Lu lat., 2. Kur
33	31	♀	0	334	Lu lat.
34	30	♂	0	266	Lu lat., Ende 3. Kur
41	28	♂	0	316	Lu II, 3 kombinierte Kuren
42	30	♂	4	166	Lu II
45	22	♀	0	306	Lu, Frühgeburt M 2
84	27	♀	2	202	Lu, lat., 4 Kuren
85	42	♀	$^1/_2$	278	Lu III, Infekt. 1919, seitdem 3 Kuren
86	50	♂	0	218	Lu lat., 6 Kuren seit 1914
88	30	♂	0	294	Lu lat.
90	32	♀	$3^1/_2$	170	Lu lat., 2 Kuren
91	28	♀	4	294	Lu lat.
94	35	♂	$1^1/_2$	290	Lu lat., 4 Kuren
102	35	♂	6	240	Lu II, 5. Kur
101	37	♀	3	162	Lu lat.
103	28	♂	$3^1/_2$	222	Lu lat.

Wir finden also in 21 Fällen ein vermindertes oder aufgehobenes Fettspaltvermögen, in zwei Fällen ist es in normalen Grenzen. Der Durchschnitt aller Fälle, 1,97, ist also stark herabgesetzt.

Der Cholesterinwert ist in 18 Fällen stark erhöht (180 bis 342 mg), in fünf Fällen normal (128 bis 170 mg). Der Durchschnitt aller Fälle ist stark erhöht, 245 mg in 100 ccm Serum.

Es erscheint uns bemerkenswert, daß die drei am Anfang stehenden Fälle von sicherem Primäraffekt und noch negativer Seroreaktion ein fast aufgehobenes Fettspaltvermögen und stark erhöhten Cholesterinspiegel zeigen. Auf Fall 5, der ein entgegengesetztes Verhalten zeigt, wird später eingegangen werden.

II. Seropositive Lues (56 Fälle).

Zusammenhänge zwischen den Abstufungen und Arten der positiven Serumreaktion (*Wassermann, Sachs-Georgi, Dold, Stern*) einerseits und Fettspaltvermögen und Cholesterinspiegel andererseits waren nicht festzustellen. Wir haben deshalb die feineren serologischen Differenzen der nun folgenden positiven Fälle nicht angeführt.

Tabelle II.

Nr.	Alter Jahre	Geschlecht	Fettspalt-Vermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg	Bemerkungen
8	38	♂	2	240	Lu lat.
16	20	♀	2	240	Chorioiditis luetica
19	56	♂	1	388	Frische Lu 2
18	20	♂	3	168	Lu congenit? Vater hat Tabes.
20	23	♀	2	288	Frühgeburt im 7. Monat, Lu II
21	50	♀	5	166	Vor 20 Jahren Lu, jetzt Ca uteri
22	24	♂	0	244	Lu II + Go.
23	34	♂	0	340	Lu II + Go.
24	25	♂	0	346	Lu II in Kuren
25	50	♂	1	236	Lu III, vitium cordis
31	21	♂	0	210	Ulcus mixt.
35	33	♀	3	166	In 12 Jahren 3 Kuren
36	63	♂	0	318	Lu III, 5 Kuren
37	23	♂	1	310	Ende 3. Kur
39	25	♂	0	348	Lu II, früher 2 Kuren
40	29	♂	2	222	Lu II, Beginn 2. Kur
44	41	♂	0	166	Lu lat.
51	40	♂	0	340	Lu II
52	27	♀	0	284	Lu lat.
50	20	♂	0	342	Lu II
53	22	♂	0	310	Lu II
54	55	♂	1	289	Lu II + Skabies.
56	35	♂	2	240	Lu II
57	36	♀	1½	165	Lu II, 5. Kur
58	43	♂	1	184	Lu Dermatidis
59	58	♂	2½	222	Lu III
60	25	♂	0	150	Lu lat.
61	30	♀	0	176	Lu lat.
63	25	♀	0	243	Lu II
66	26	♂	1	256	Lu lat.
68	28	♂	0	158	Lu II
69	23	♂	5½	240	Lu II, Beginn 5. Kur
70	32	♂	2½	270	Lu II, Ende 2. Kur
71	24	♀	3	282	Lu lat., 2. Kur
72	25	♀	4	188	Lu II, Anfang 2. Kur
73	21	♀	4	226	Lu II, 3. Kur
74	30	♀	1	150	Lu II
75	27	♀	½	216	Lu II
76	60	♀	1½	276	Lu lat.
78	24	♀	0	212	Lu lat.
80	47	♀	0	140	Lu II
81	32	♀	0	206	Dementia paralytica
82	28	♀	0	212	Lu lat.

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Alter Jahre	Geschlecht	Fettspalt-vermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg	Bemerkungen
83	18	♀	0	220	Lu II, 1. Kur
87	19	♀	0	226	Lu II, 1. Kur
89	35	♂	2	270	Lu cerebri, Ende 1. Kur
92	24	♂	0	240	Lu II, 1. Kur
93	17	♀	5	140	Lu II, Ende 5. Kur
98	42	♀	0	180	Lu II
99	40	♂	3	168	Paralyse
100	15	♀	0	165	Lu conegnit.
101	28	♀	3	198	Lu lat.
77	19	♀	0	210	Lu congenit., Ende 7. Kur
79	13	♀	0	260	Lu congenit.
97	12	♀	3	180	Lu congenit.
62	53	♂	8	98	Lu cerebri? Neuere Lues?

Wir finden also normales Fettspaltvermögen (Fall 5 bis 8) in nur drei Fällen, in den 53 anderen Fällen ist es vermindert oder aufgehoben, der *Durchschnittswert* sämtlicher Fälle ist 1,43. Der Cholesterinwert ist in 14 Fällen nicht vermehrt (unter 180 mg), in 42 Fällen stark vermehrt (bis 388 mg). Der *Durchschnittswert* sämtlicher Fälle beträgt 233 mg.

Besonders hinzuweisen ist auf die am Ende der Tabelle stehenden Fälle von kongenitaler Lues (Fall 77, 79, 97, 100). Trotz der Jugend der Patientinnen ist das Fettspaltungsvermögen in drei Fällen aufgehoben, im vierten stark herabgesetzt. Der Cholesterinspiegel ist im Fall 100 an der oberen Grenze der Norm, bei den Fällen 77, 79, 97 erhöht.

Als letzten Fall haben wir 62 angeführt, der ebenso wie Fall 5 der Tabelle I ein hohes Fettspaltvermögen bei niederem Cholesteringehalt zeigt, somit unseren sonstigen Ergebnissen widerspricht. Eine Erklärung dafür vermögen wir nicht zu geben; sie wäre vielleicht zu finden in der Auffassung *Bergels*[1]), der ein mit der Steigerung des Immunitätsgrades parallel gehendes Fettspaltvermögen annimmt. Im Gegensatz dazu ergeben unsere Untersuchungen bei 74 von 79 Luesfällen ein herabgesetztes oder aufgehobenes Fettspaltvermögen.

Einen Einblick in den Zusammenhang der verschiedenen von uns registrierten Reaktionen könnte wohl nur eine häufig wiederholte Untersuchung an einer größeren Zahl von Fällen geben. Wir hatten nur bei drei Fällen Gelegenheit zu wiederholter Untersuchung, deren Ergebnis Tabelle III gibt.

Eine eindeutige Verschiebung von Fettspaltvermögen und Cholesterinspiegel mit der Änderung der serologischen Reaktionen ist hier nicht festzustellen, jedoch scheint bei Fall *M.* und *F.*, sowie bei den Fällen 69, 71, 72, 73, 90, 93, 102 unter dem Einfluß energischer Behandlung ein relativ hohes Fettspaltvermögen sich eingestellt zu haben. Bei der Komplikation der Verhältnisse durch die Beeinflußbarkeit von Fettspaltvermögen und Cholesterinspiegel durch anderweitige, vor allem Hautinfektionen und alimentäre Zustände läßt sich jedoch nur von großen und oft wiederholten Reihenuntersuchungen eine Klärung des Zusammenhangs erwarten.

[1]) *Bergel*, Münch. med. Wochenschr. 1926, S. 140.

Tabelle III.

Fall	Geschlecht	Alter Jahre	Datum	WaR	SGg	Stern	Dold	Fettspaltvermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg	Bemerkungen
M.	♂	25	1. XII.	++	—	Kl. los.	—	0	348	Lu II, vor 2 Jahren Salv.-Kur.
			4. XII.	++	++	„ „	++	0	240	Salv. + Bi.
			6. I.	++	+	++	++	$4^1/_2$	282	
F.	♂	25	?	—	—	—	—	0	250	P. A. Spir. ++
			8 Tage später	++	++	++	++	2	240	Inzw. Beg. mit Salv.-Kur.
H.	♂	22	?	++	+	+	+	5	208	Lu II, Inf. vor 2 Jahren
			1 Monat später	++	++	++	++	0	310	Salv. + Bi.-Kur
				++	++	++	++	0	278	

Die starken Schwankungen der von uns beobachteten Seroveränderungen gehen auch aus unseren nicht luetischen Kontrollfällen hervor.

Tabelle IV.

Kontrollfälle.

Nr.	Alter Jahre	Geschlecht	Fettspaltvermögen	Cholesterin in 100 ccm Serum mg	Diagnose
2	45	♀	6	138	?
3	36	♀	6	124	?
6	25	♂	$8^1/_2$	132	?
7	56	♂	$1^1/_2$	188	Skabies
11	21	♂	6	178	Sexual-Neurasthenie
9	14	♀	3	218	Skabies
12	35	♀	5	163	Ge z. B. Lu
14	17	♀	8	150	?
29	59	♀	$5^1/_2$	128	Hysterie — Neurasthenie
43	31	♂	$3^1/_2$	256	Leichte Grippe, vor $^1/_4$ Jahr in mehrmaliger Unters. FSV = 10
49	22	♂	6	150	Schizophrenie
55	52	♂	5	210	Ikterus
67	28	♀	10	140	Neurasthenie
15	52	♀	3	210	Klimax
95	36	♀	$3^1/_2$	125	Geistesstörung
96	22	♀	$3^1/_2$	160	z. B. Lu

Wir finden somit bei den Kontrollfällen trotz der Beeinflussung durch andere Erkrankungen einen wesentlichen höheren Durchschnittswert für das Fettspaltvermögen (von $1^1/_2$ bis 10); der niedrigste Wert $1^1/_2$ findet sich bei einem 56 jährigen Skabiespatienten; auch der andere, nur 14 jährige Skabiespatient zeigt herabgesetztes Fettspaltungsvermögen und erhöhten Cholesterinspiegel. Die anderen Fälle mit stärkeren Abweichungen von der Norm betreffen einen leichten Grippefall (43), einen Fall von Ikterus und einen Fall von klimakterischen Störungen (15), wo diese Veränderungen, wie

andererorts erwähnt, außerordentlich häufig sind. Ebenso ist bei Ikterus die Erhöhung des Cholesterinspiegels schon beschrieben. Durch diese letztgenannten Fälle ist der durchschnittliche Cholesterinwert, 166 mg, etwas über die sonst beschriebene Norm erhöht.

Der Unterschied der bei den Kontrollfällen gefundenen Durchschnittswerte von den Durchschnittswerten bei Lues ist jedoch so augenfällig, daß uns trotz Schwankens der Befunde bei einzelnen Fällen die Tendenz zur Erhöhung des Cholesterinspiegels und noch ausgesprochener zu starker Verminderung des Fettspaltvermögens bei Lues bewiesen erscheint. Der Zusammenhang zwischen Herabsetzung des Fettspaltvermögens und Erhöhung des Cholesterinspiegels ist jedoch nicht so ausgeprägt, wie bei arteriosklerotischer und essentieller Hypertonie. Wir finden bei Lues relativ häufig stark herabgesetztes Fettspaltvermögen bei annähernd normalem Cholesterinspiegel.

Zusammenfassung.

1. Bei seronegativer, klinisch sicherer Lues (23 Fälle) ist das Fettspaltvermögen in 2 Fällen normal, in 21 Fällen vermindert oder aufgehoben. Der Cholesteringehalt des Serums ist in 5 Fällen normal, in 18 erhöht. Bei drei Primäraffekten sind die Veränderungen besonders ausgeprägt. Der Durchschnittswert aller Fälle beträgt für Cholesterin **245 mg** in 100 ccm Serum, für Fettspaltvermögen **1,97 mg.**

2. Bei seropositiver Lues (56 Fälle) finden wir das Fettspaltvermögen in 3 Fällen normal, in 53 Fällen vermindert oder aufgehoben. Der Cholesterinspiegel ist in 14 Fällen normal, in 42 stark erhöht. Die Durchschnittswerte betragen für Fettspaltvermögen **1,43 mg,** für Cholesterin **233 mg** in **100** ccm Serum.

3. Bei einigen unserer zum Teil wiederholt untersuchten Fälle finden wir bei hohem Cholesterinspiegel ein relativ hohes Fettspaltvermögen, das wahrscheinlich auf den Einfluß energischer Behandlung zurückzuführen ist.

4. Als Kontrolle untersuchte Fälle anderer Erkrankungen ergaben für Cholesterin 166 mg, für Fettspaltvermögen 5,25 mg als Durchschnittswert.

5. Bei Lues aller Stadien ist eine deutliche Tendenz zur Verminderung des Fettspaltvermögens festzustellen. Die schon früher beschriebene Erhöhung des Cholesterinspiegels ist bei drei Vierteln unserer Fälle vorhanden, jedoch nicht so häufig und weniger ausgesprochen als die Verminderung des Fettspaltvermögens.

Literatur.

J. Bauer, Wien. klin. Wochenschr. 1912, S. 1376. — *Carbone* und *Nizzi*. Biochemica 1913 und 1914. — *L. Berczeller*, *A. Schillinger*, diese Zeitschr. **90**, 1918. — *M. Dörle* und *H. v. Weiss*, ebendaselbst **167**, 1926. — *E. Fränkel*. Münch. med. Wochenschr. 1919. — *J. Jakobi*, Festschr. f. Prof. *Lechner Kolozwar* 1915. — *W. Klein*, *L. Dinkin*, Zeitschr. f. phys. Chem. 1914.

Über die Oxydation der Oxalsäure durch Jodsäure in wässeriger Lösung.

Von

Shigeru Toda.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 2. März 1926.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

I. Historisches.

Im Jahre 1844 beobachtete *E. Millon*[1]), daß die oxydierende Wirkung der Jodsäure auf organische Substanzen ausbleibt, wenn man dem Reaktionsgemisch eine kleine Menge Blausäure hinzufügt. Zucker, Ameisensäure oder Oxalsäure, die in wässeriger Lösung von Jodsäure angegriffen werden, bleiben bei Gegenwart „fast homöopathischer" Mengen an Blausäure unverändert.

Weder *Millon* noch spätere Autoren, die sich mit der Erscheinung beschäftigten, haben eine Erklärung gefunden. In seiner bekannten Arbeit über die Wirkung der Blausäure auf die lebendige Substanz führt *Geppert*[2]) die *Millon*schen Systeme als Analoga an und meint, man würde die Wirkung der Blausäure auf die lebendige Substanz wohl verstehen, wenn man erst *Millons* Beobachtung erklären könnte.

II. Fragestellung.

Wir beschäftigen uns im folgenden mit dem übersichtlichsten der *Millon*schen Systeme, mit dem System Jodsäure—Oxalsäure, das in wässeriger Lösung bei Zimmertemperatur nach der Bilanzgleichung reagiert:

$$2\,HJO_3 + 5\,H_2C_2O_4 = 6\,H_2O + 10\,CO_2 + J_2.$$

Da dieser Vorgang durch Blausäuremengen gehemmt wird, die gegen die Mengen an Jodsäure oder Oxalsäure zu vernachlässigen sind, so ist von vornherein klar, daß der Blausäurewirkung weder eine Reaktion mit Jodsäure noch eine Reaktion mit Oxalsäure zugrunde liegt. Vielmehr muß in Jodsäure—Oxalsäurelösungen eine Substanz

[1]) C. r. 19, 270, 1844.

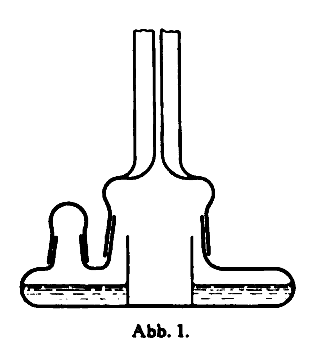
[2]) Über das Wesen der Blausäurevergiftung. Berlin, A. Hirschwald, 1889.

vorhanden sein, die in einem stöchiometrischen Verhältnis zu der hemmenden Blausäuremenge steht. Die Substanz muß die Eigenschaft haben, Jodsäure—Oxalsäurelösungen zum Umsatz zu bringen, und muß diese Eigenschaft verlieren, wenn sie sich mit Blausäure verbindet. Ich habe auf Vorschlag von Herrn *Otto Warburg* nach dieser Substanz gesucht und berichte im folgenden über das Ergebnis meiner Versuche.

III. Meßmethoden.

Da bei der Oxydation der Oxalsäure durch Jodsäure als Endprodukt Kohlensäure entsteht, so kann die Geschwindigkeit der Oxydation manometrisch, durch Beobachtung des entwickelten Kohlensäuredrucks, gemessen werden.

Zum Versuch wurden gleiche Volumina n Jodsäure (176 g : 1000 und n Oxalsäure (126/2 g : 1000) gemischt. Je 4 ccm dieses Säuregemisches, das in bezug auf jede Säure n/2 war, wurden in Gefäße von der Form der Abb. 1 eingefüllt. Das Gesamtvolumen der Gefäße, die aus Jenaer Glas hergestellt waren, betrug etwa 30 ccm. Der Einsatz der Gefäße blieb leer, der Gasraum wurde mit Luft gefüllt.


Abb. 1.

Die Gefäße wurden, mit Manometern verbunden, in einen auf 18 bis 19° einstehenden Wasserthermostaten eingehängt und zunächst 10 Minuten geschüttelt, bis Temperatur und Druckgleichgewicht eingetreten war. Dann wurden die auftretenden positiven Drucke beobachtet, die von der Entwicklung der Kohlensäure herrührten. Die Gefäßkonstanten[1]) für Kohlensäure (k_{CO_2}) waren etwa 2,7, was bedeutet, daß 1 mm Druckzunahme die Entwicklung von 2,7 cmm Kohlensäure anzeigte.

IV. Vorversuche.

Vorversuche stellte ich an, indem ich gleiche Mengen des n/2 Jodsäure — Oxalsäuregemisches in Reagenzgläser einfüllte und den Fortschritt der Reaktion an der zunehmenden Braunfärbung beobachtete, die von dem ausgeschiedenen Jod herrührte. Es sei bemerkt, daß diese einfache Anordnung für Blausäureversuche nicht geeignet ist, da Blausäure und Jod unter Bildung farblosen Jodcyans reagieren.

Es zeigte sich bei den Vorversuchen, daß die Reaktion zwischen Oxalsäure und Jodsäure durch Metallsalze beschleunigt wird. Am

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 100, 230, 1919. $\left(k_{CO_2} = \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}}{P_0}\right)$.

wirksamsten erwiesen sich Eisen- und Kobaltsalze, die in einer Konzentration von n/10000 deutlich beschleunigten. Weniger wirksam waren Mangan- und Kupfersalze.

V. Quantitative Versuche mit ungereinigter Jodsäure und Oxalsäure.

Unter „ungereinigter“ Jodsäure und Oxalsäure verstehe ich die reinsten *Kahlbaum*schen Präparate. Tabelle I und Abb. 2 zeigen den Verlauf eines manometrischen Versuchs. Die Geschwindigkeit der Reaktion nimmt im Laufe von 3 Stunden langsam zu, 4 ccm des Säuregemisches haben nach 3 Stunden etwa 450 cmm Kohlensäure entwickelt, der Manometerausschlag in dieser Zeit beträgt etwa 170 mm.

Tabelle I.

4 ccm n/2 Jodsäure—Oxalsäure (ungereinigt), Temperatur 18,0° C.

t Minuten	CO_2 im cmm	5proz. KOH im Einsatz cmm	t Minuten	CO_2 in cmm	5proz. KOH im Einsatz cmm
0	0,0	0,0	100	181,7	0,0
20	21,8	0,0	120	240,0	0,0
40	50,7	0,0	140	299,9	0,0
60	88,8	0,0	160	366,5	0,0
80	133,6	0,0	180	444,9	0,0

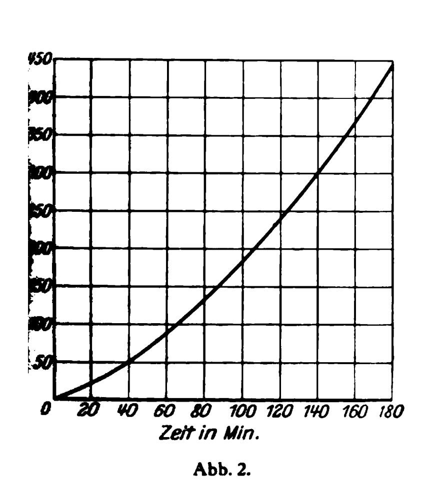


Abb. 2.

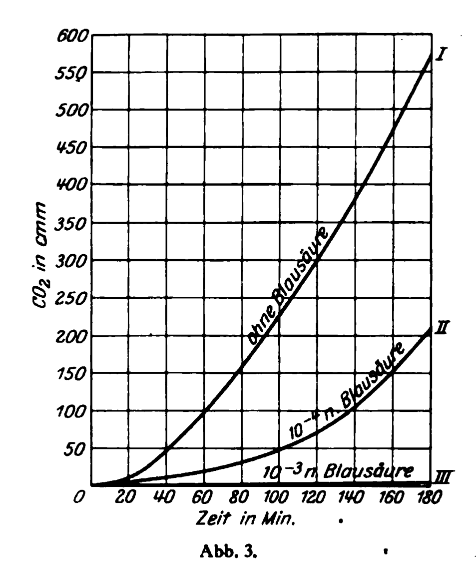


Abb. 3.

Der Versuch der Tabelle I war mit einer Kontrolle verbunden, die entscheiden sollte, ob das entwickelte Gas ausschließlich Kohlensäure sei. Zu dem Zwecke enthielt der Einsatz des Kontrollgefäßes

5proz. Kalilauge. Die Druckänderung in diesem Gefäß war und blieb Null, was beweist, daß sich neben Kohlensäure ein anderes Gas nicht entwickelt.

Tabelle II und Abb. 3 zeigen den Einfluß der Blausäure. n/10000 Blausäure hemmt die Reaktion stark, n/1000 Blausäure hemmt sie fast vollständig.

Tabelle II.

4 ccm n/2 Jodsäure—Oxalsäure (ungereinigt), Temperatur 19,0° C.

	1	3	2		1	3	2
t Min.	Ohne KCN CO_2 in cmm	n/1000 KCN CO_2 in cmm	n/10000 KCN CO_2 in cmm	t Min.	Ohne KCN CO_2 in cmm	n/1000 KCN CO_2 in cmm	n/10000 KCN CO_2 in cmm
0	0,0	0,0	0,0	100	228,7	3,5	48,4
20	10,8	0,0	0,0	120	305,9	3,8	73,1
40	47,3	0,5	12,4	140	381,5	3,5	104,4
60	100,7	2,7	22,4	160	477,4	2,7	153,2
80	158,0	3,0	31,1	180	572,9	3,2	212,2

Die Frage, ob die Wirkung der Blausäure reversibel sei, wurde durch folgende Anordnung entschieden: Ein Säuregemisch, das in bezug auf Blausäure n/1000 war, wurde in zwei Teile geteilt. Ein Teil des Gemisches blieb in geschlossener Flasche stehen, durch den anderen Teil wurde 1 Stunde lang ein schneller Luftstrom geblasen. Dann wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in beiden Gemischen manometrisch gemessen. Wie man aus Tabelle III und Abb. 4 sieht, ist die Blausäurehemmung vollkommen reversibel, denn nach der Durchlüftung finden wir eine normale Reaktionsgeschwindigkeit (Kurve II der Abb. 4), während die Reaktionsgeschwindigkeit in dem nicht durchlüfteten Anteil Null ist[1]) (Kurve I der Abb. 4).

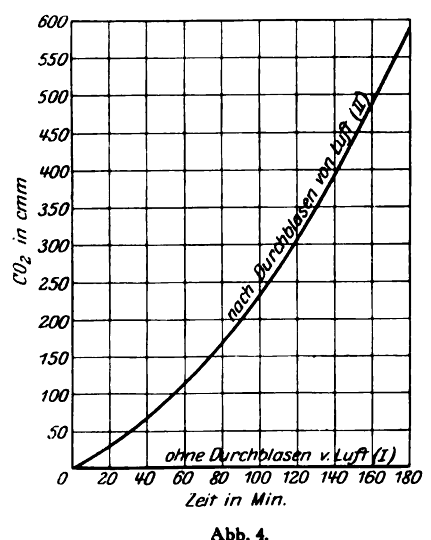


Abb. 4.

[1]) Gegner der Schwermetalltheorie der Atmung führen oft an, daß die Wirkung der Blausäure auf die lebendige Substanz reversibel sei, während die Bindung des Eisens in den Eisencyanwasserstoffsäuren praktisch irreversibel sei. Sie vergessen dabei, daß es neben $H_3Fe(CN)_6$ und $H_4Fe(CN)_6$ noch andere komplexe Blausäuremetallverbindungen gibt.

Tabelle III.

4 ccm n/2 Jodsäure—Oxalsäure (ungereinigt), Temperatur 19,0° C.

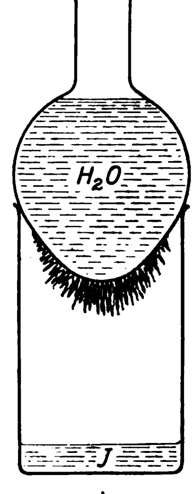
t Min.	n/1000 HCN 1 Std. durchlüftet CO_2 in cmm	n/1000 HCN 1 Std. stehengelassen CO_2 in cmm	*t* Min.	n/1000 HCN 1 Std. durchlüftet CO_2 in cmm	n/1000 HCN 1 Std. stehengelassen CO_2 in cmm
0	0,0	0,0	100	234,9	0,0
20	28,4	0,0	120	307,8	0,0
40	68,3	0,0	140	391,5	0,0
60	112,1	0,0	160	488,7	0,0
80	166,1	0,0	180	588,6	0,0

VI. Reinigung der Jodsäure und Oxalsäure.

Nach dem bisherigen beschleunigt Eisensalz die Reaktion in etwa n/10000 und hemmt Blausäure die Reaktion in etwa n/10000. Weil Blausäure die Reaktion in kleiner Konzentration hemmt, muß eine katalytisch beschleunigte Reaktion vorliegen. Weil Eisen in Konzentrationen von derselben Größenordnung beschleunigt und weil Eisen in allen Laboratoriumspräparaten als Verunreinigung vorkommt, lag die Vermutung nahe, daß der Katalysator der ungereinigten Lösungen Eisen sei.

Zur Prüfung dieser Annahme habe ich die Oxalsäure und die Jodsäure so weit frei von Eisen hergestellt, als dies möglich war. Die Oxalsäure wurde sechsmal aus „eisenfreiem" Wasser umkristallisiert und hinterließ dann nach dem Veraschen keine nachweisbare Menge Eisen mehr. Schwieriger war die Reinigung der Jodsäure, die beim Umkristallisieren immer Eisen mitriß. Nach längeren erfolglosen Reinigungsversuchen ging ich dazu über, die Stoffe, aus denen die Jodsäure hergestellt wird — Jod und Salpetersäure —, zu reinigen und aus den gereinigten Ausgangsstoffen Jodsäure herzustellen.

Das Jod wurde, wie aus Abb. 5 ersichtlich, sublimiert, und zwar sehr langsam, um ein Mitreißen von Verunreinigungen zu vermeiden. Von den Jodkristallen, die sich an dem mit Wasser gefüllten Kolben ansetzten, wurden nur solche ausgewählt, die die Wand des Kolbens nicht berührten.



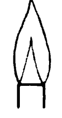


Abb. 5.

Die Salpetersäure wurde langsam aus einem Glaskolben in eine glasurfehlerfreie Porzellanschale destilliert, wobei, wie Abb. 6 veranschaulicht, nur solche Säure aufgefangen wurde, die sich in dem Fraktionierrohr nicht kondensiert hatte. Nur

gasförmige, nicht flüssige Säure gelangte in die vorgelegte Porzellanschale.

Zur Herstellung der Jodsäure wurde das sublimierte Jod mit der zehnfachen Menge der destillierten Salpetersäure in einer glasurfehlerfreien Porzellanschale übergossen, auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, der bräunliche Rückstand in wenig Wasser gelöst, wieder auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und bei 110° getrocknet. Dann wurde Aufnehmen mit Wasser und Verdampfen auf dem Wasserbade wiederholt und schließlich im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

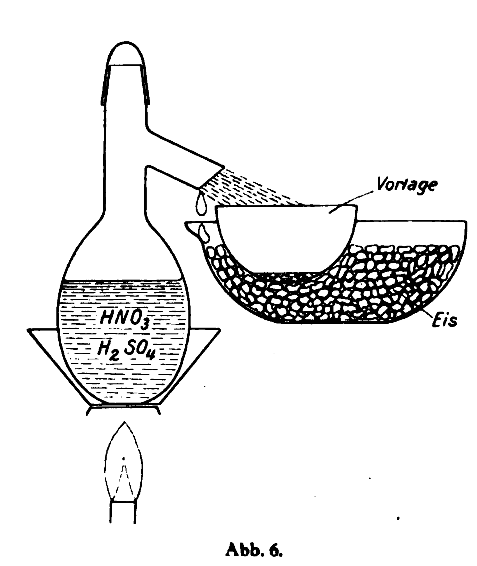


Abb. 6.

Auf diese Weise wurde rein weiße Jodsäure in Mengen von $\frac{1}{2}$ bis 1 g gewonnen. Zur Prüfung auf Eisen wurde im Porzellantiegel geglüht, wobei die Jodsäure sich unter Zersetzung verflüchtigte. Im Rückstand ließ sich kein Eisen nachweisen, was bei der Empfindlichkeitsgrenze der Rhodanreaktion besagt, daß 1 g Jodsäure weniger als 10^{-4} mg Eisen enthielt, während sich in 1 g der ungereinigten Säure immer Eisenmengen von etwa 10^{-3} mg fanden.

VII. Versuche mit gereinigter Jodsäure und Oxalsäure.

Durch die Reinigung sank die Reaktionsgeschwindigkeit des Jodsäure—Oxalsäuregemisches auf rund $^1/_{10}$. Zusatz von 10^{-5} mg Eisen (in Form von Eisensulfat) zu 4 ccm des Säuregemisches hatte einen eben meßbaren, Zusatz von 10^{-4} mg Eisen einen deutlich beschleunigenden Einfluß auf die Reaktion. 10^{-3} mg Eisen, zu 4 ccm des Säuregemisches zugesetzt, stellte etwa die Reaktionsgeschwindigkeit der ungereinigten Lösungen her. Das Gesagte wird belegt durch Tabelle IV und Abb. 7 sowie Tabelle V und Abb. 8.

Blausäure brachte die Wirkung des zugesetzten Eisens zum Verschwinden. Wurde beispielsweise der Umsatz durch Zugabe von Eisen versiebenfacht, so sank er in n/1000 Blausäure auf Null (Tabelle VI und Abb. 9).

Tabelle IV.

:m n/2 Jodsäure—Oxalsäure (gereinigt), Temperatur 18,0° C (vgl. Abb. 7).

inuten	Kurve I	Kurve II	Kurve III	Kurve IV	Kurve V
	Ohne Fe CO_2 in cmm	10^{-5} mg Fe CO_2 in cmm	10^{-4} mg Fe CO_2 in cmm	5.10^{-4} mg Fe CO_2 in cmm	10^{-3} mg Fe CO_2 in cmm
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20	2,8	5,4	5,6	12,6	23,0
40	8,4	9,5	11,2	28,0	52,7
60	12,6	16,2	18,2	46,2	85,1
80	19,6	23,0	28,0	71,4	124,2
100	26,6	31,1	36,4	96,6	171,5
120	33,6	41,9	51,8	127,4	224,1
140	42,0	50,0	64,4	159,6	283,5
160	50,4	62,1	79,8	197,4	352,4
180	61,6	74,3	96,6	236,6	423,9

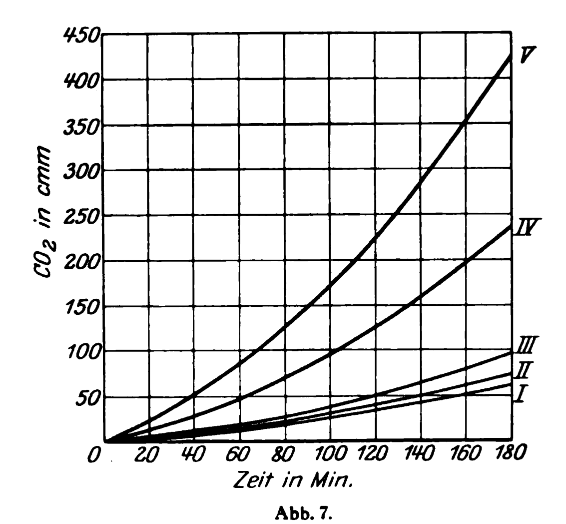


Abb. 7.

Tabelle V.

4 ccm n/2 Jodsäure— Oxalsäure, Temperatur 18,0° C (vgl. Abb. 8).

Minuten	Unrein CO_2 in cmm	Gereinigt CO_2 in cmm	Minuten	Unrein CO_2 in cmm	Gereinigt CO_2 in cmm
0	0,0	0,0			10^{-3} mg F. eingekippt
20	23,8	4,1	140	351,4	77,0
40	56,0	10,8	160	435,4	118,8
60	98,0	16,2	180	522,2	167,4
80	147,0	24,3	200	618,8	228,2
100	204,4	31,1	220	721,0	294,3
120	271,6	39,2	240	845,6	379,4

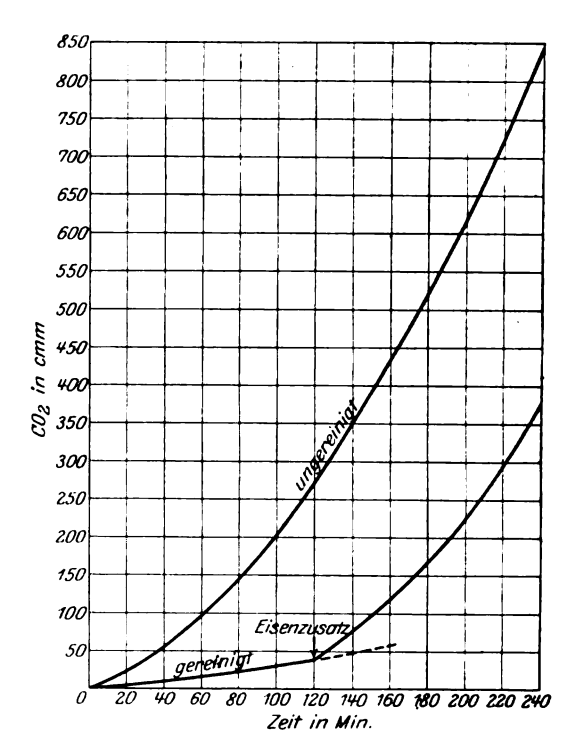

850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
CO_2 in cmm
ungereinigt
Eisenzusatz
gereinigt
20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240
Zeit in Min.

Abb. 8.

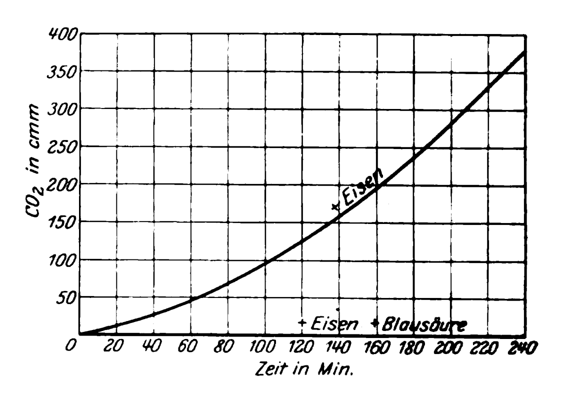

400
350
300
250
200
150
100
50
0
CO_2 in cmm
+ Eisen
+ Eisen + Blausäure
20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240
Zeit in Min.

Abb. 9.

Tabelle VI.

4 ccm n/2 Jodsäure—Oxalsäure (gereinigt), Temperatur 18,0° C (vgl. Abb. 9).

Minuten	$+0{,}5 . 10^{-3}$ mg Fe CO_2 in cmm	$+ 0{,}5 . 10^{-3}$ mg Fe m/1000 KCN CO_2 in cmm	Minuten	$+0{,}5 . 10^{-3}$ mg Fe CO_2 in cmm	$+ 0{,}5 . 10^{-3}$ mg Fe n/1000 KCN CO_2 in cmm
0	0,0	0,0	140	159,6	0,0
20	12,6	0,0	160	197,4	0,0
40	28,0	0,0	180	236,6	0,0
60	46,2	0,0	200	284,2	0,0
80	71,4	0,0	220	331,8	0,0
100	96,6	0,0	240	379,4	0,0
120	127,4	0,0			

Zusammenfassung.

1. Mindestens 90 Proz. des Umsatzes, den ich in ungereinigten Jodsäure—Oxalsäurelösungen fand, war durch katalytische Wirkung von Eisen hervorgerufen.

2. Mindestens 90 Proz. der Blausäurewirkung, die ich bei Zugabe von Blausäure zu ungereinigten Jodsäure—Oxalsäuregemischen beobachtete, beruhte auf einer Reaktion der Blausäure mit Eisen.

3. Eisenmengen von 10^{-5} mg, gelöst in 4 ccm, können durch ihre katalytische Wirkung auf gereinigte Jodsäure—Oxalsäurelösungen noch nachgewiesen werden, das sind Mengen, die mit den Eisenreagenzien der analytischen Chemie nicht mehr auffindbar sind.

4. Es ist wahrscheinlich, wenn auch nicht zu beweisen, daß schwermetallfreie Lösungen von Jodsäure und Oxalsäure bei Zimmertemperatur nicht reagieren. Der Schluß ist unbeweisbar, weil Eisenmengen, die nicht mehr analytisch nachweisbar sind, einem gereinigten Säuregemisch zugesetzt, den Umsatz beschleunigen. Der Schluß ist wahrscheinlich, weil Blausäure nicht nur die Wirkung des zugesetzten Eisens, sondern den ganzen Umsatz zum Verschwinden bringt. Schwerlich wird man die Annahme in Erwägung ziehen, daß es in Jodsäure—Oxalsäurelösungen zwei Arten von antikatalytischer Blausäurewirkung gibt, eine erste, die 90 Proz. des Umsatzes hemmt und auf einer Reaktion mit Eisen beruht, und eine zweite, die 10 Proz. des Umsatzes hemmt und unbekannter Art ist.

5. Die Wirkung der Blausäure in den Jodsäure-Oxalsäurelösungen ist reversibel.

6. Hinsichtlich der Form, in der das Eisen in den Jodsäure—Oxalsäurelösungen katalytisch wirksam ist, möchte ich die Vermutung äußern, daß es sich um komplexe Eisenverbindungen handelt, an deren Aufbau neben der Jodsäure vielleicht auch die Oxalsäure beteiligt ist. Eine katalytische Wirkung der freien Eisenionen kommt aus vielen Gründen nicht in Frage.

Zur Beeinflussung von bioelektrischen Potentialdifferenzen durch die Röntgenstrahlen.

Von

Adolf Liechti (Bern).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern und dem therapeutischen Röntgeninstitut des Inselspitals Bern.)

(Eingegangen am 2. März 1926.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Alle die mannigfaltigen Wirkungen, die wir bei Bestrahlungen des menschlichen und tierischen Organismus beobachten, sind bedingt und sicher auch in einer bestimmten graduellen Abhängigkeit von den Primärvorgängen, die sich an der Zelle und deren Milieu am Orte der Strahlenabsorption abspielen.

Der in der Literatur allgemein begangene Weg, aus den sekundären Erscheinungen zurück auf die primären Vorgänge zu schließen, scheint für die Aufklärung des feineren Wirkungsmechanismus der Röntgenstrahlen wenig geeignet zu sein. Er hat auf unzähligen Seitengassen zu Irrtümern geführt. Ich glaube deshalb, daß man mit Vorteil umgekehrt vorgeht, nämlich von dem gesicherten Boden der Physik fortschreitend nach und nach über möglichst einfache und eindeutige physiko-chemische Versuchsanordnungen, die als partielle Phantome für die lebende Zelle gelten dürfen, auf das biologische Gebiet vorstößt.

Ein Strahl kann im Gewebe nur wirken, wenn er absorbiert wird. Die Absorption, der *physikalische Primärvorgang*, ist der erste Akt der Röntgenstrahlenwirkung. Das Wesen der Absorption elektromagnetischer Schwingungen besteht ganz allgemein in einer Veränderung des physikalischen Gefüges der Atome und Moleküle der Materie, in unserem Falle des lebenden Gewebes. Dieser neue Zustand sei vorläufig nur durch die Anwesenheit von energiereicheren Atomen gekennzeichnet. Dieselben sind von vornherein, entsprechend der großen Zahl der einzelnen Absorptionsereignisse, diffus und wohl regelmäßig in dem Gewebe verteilt. Eine Wirkungsmöglichkeit ist also in jedem Punkte der Zelle — gleiche Strahlen und gleiche Substanz vorausgesetzt — in gleicher Weise gegeben. Die energiereicheren Atome können aber an bestimmten Stellen, z. B. an bestimmten Teilen der Zelle oder des Zellverbandes, eine ganz besondere Wirkung, physikalisch-chemischer Art ausüben. Der physikalische Primärvorgang führt also

wahrscheinlich zu einer in bezug auf die Zelle inhomogenen Wirkung. Diese neue Veränderung stellt den zweiten wichtigen, noch nicht aufgeklärten Akt der Strahlenwirkung dar. Ich möchte ihn den *biologischen Primärvorgang* nennen. Er ist die Folge des vorigen und ist charakterisiert und gegeben durch Gestalt und Zusammensetzung der Zelle, ähnlich wie die Absorption gegeben ist durch die Zusammensetzung der Materie. Der Effekt, den der biologische Primärvorgang bewirkt, kann zeitlich mit der Bestrahlung identisch sein, d. h. er kann mit der Bestrahlung beginnen und mit der Unterbrechung derselben enden. Er kann dieselbe aber auch überdauern. Die Vergrößerung des Energieinhalts, die durch diese Zustandsänderung zustande kommt, kann ganz durch die durch den physikalischen Primärvorgang gelieferte Energie gedeckt werden, oder die Strahlung kann nur dazu verwendet werden, um in der Zelle selbst ablaufende thermodynamische Kreisprozesse zu steuern. Die Bestrahlung würde sich dann zum Bestrahlungseffekt, wie Reiz zu Reizerfolg, verhalten.

Alle diese Vorgänge ihrerseits haben, wenn die Intensität der Bestrahlung groß genug war, Veränderungen zur Folge, die den Gesamtstoffwechsel und somit auch den des Zellverbandes stören. Sie sind zellphysiologisch und vielleicht schon morphologisch erfaßbar. Sie überdauern jedenfalls die Bestrahlung oder treten sogar erst nach Unterbrechung derselben auf. Die betroffene Zelle kann sich nach kürzerer oder längerer Zeit wieder restituieren, oder es kann der Tod derselben eintreten. Alle diese Folgen sind *sekundäre Wirkungen am Orte der Strahlenabsorption*. Sie sind besser erforscht als der biologische Primärvorgang, aber schlechter als der physikalische Primärvorgang.

Diese drei ersten Akte, physikalischer und biologischer Primärvorgang, sowie Sekundärwirkung am Orte der Strahlenabsorption, spielen sich lediglich in den primär bestrahlten Gebieten ab.

Durch die veränderte Zellfunktion, die in einem veränderten Stoffwechsel zum Ausdruck kommen muß, muß auch das Milieu verändert werden, der Gewebssaft, weiterhin das Blut.

Diese letzten Veränderungen sind zusammengefaßt unter den Begriff der *sekundären humoralen Strahlenwirkungen*.

Diese ihrerseits können bewirken: 1. Reaktionen im bestrahlten Gebiet (regulatorische, morphologische); 2. Rückwirkungen auf andere Organe (funktionell-regulatorische, morphologische).

Was die Frage des physikalischen Primärvorganges anbelangt, ist derselbe durch die Atom- und Quantentheorie sowie durch die elektromagnetische Lichttheorie weitgehend geklärt. Sein Endeffekt ist für die biologischen Wirkungen in der Emission von β-Strahlen gegeben. Ich (1) habe mit anderen schon früher aus der äußerst geringen Härte der wirksamen Sekundärstrahlung von Metallen auf den Prodigiosus geschlossen, daß die sekundäre β-Strahlung das letzten Endes wirksame Agens darstellen dürfte.

Ein weiterer Beweis, daß diese Überlegung stimmt, liegt in folgendem: *Holthusen* (2) gibt aus theoretischen Gründen für die Abhängigkeit der Elektronenemission von der Ordnungszahl Z der diese emittierenden Elemente eine charakteristische Kurve, die ein Maximum und ein darauffolgendes Minimum zeigt. Dieses Maximum wird bei Änderung der Härte

der Primärstrahlung verschoben, und zwar in dem Sinne, daß bei weicher Primärstrahlung dasselbe nach der Seite des kleineren *Z* rückt. Bei meinen Versuchen am Prodigiosus habe ich gleich verlaufende Verstärkskurven erhalten. Die *experimentell* erhaltenen Kurven der Wirkungssteigerung decken sich, hinsichtlich ihrer Abhängigkeit sowohl von der Ordnungszahl als auch von der Härte der Primärstrahlung mit den von *Holthusen* für die Elektronenemission *geforderten* Kurven.

Ähnliche Resultate wie bei Bakterien erhielt ich auch am Säugetiergewebe (3).

Man könnte einwenden, daß durch alle diese Versuche doch nur die *Wirkungssteigerung* als β-Strahlenwirkung bewiesen ist. Und daß dabei gar nicht gesagt ist, daß auch die Wirkung der Primärstrahlung auf Korpuskularstrahlen zurückgeführt werden muß. Ich muß dies zugeben. Aber es ist bewiesen, daß jene äußerst weiche Strahlung, die wir als β-Strahlung erkannt haben, jedenfalls eine gewaltige Schädigung herbeiführen kann. Wenn von Metallen emittierte sekundäre β-Strahlen wirken können, dann können es auch die im Gewebe selbst ausgelösten. Wir wissen aber, daß durch harte Strahlen in jedem Körper, also auch im lebenden Gewebe, solche frei gemacht werden. Es steht also der Annahme, daß die β-Strahlen zum überwiegend größten Teil die Strahlenwirkung bedingen, absolut nichts im Wege. Im Gegenteil, ich habe ja gezeigt (l. c.), daß alle die sonst sicher in unseren Versuchen noch auftretenden Wellenstrahlen, Streu- und Fluoreszenzstrahlen, keinen in bezug auf die schädigende Wirkung auf Bakterien wahrnehmbaren Einfluß hat. Ich glaube also damit bewiesen zu haben, daß nicht nur bei der Einzelzelle, sondern auch beim lebenden Gewebe des Säugers die wirksame Strahlung durch die sekundäre β-Strahlung dargestellt wird.

Nachdem aus atomtheoretischen Gründen das Auftreten von freien Elektronen in dem von den Röntgenstrahlen getroffenen Gewebe feststeht, nachdem im biologischen Experiment bewiesen ist, daß durch sekundäre Elektronenstrahlung die Primärstrahlenwirkung bedeutend verstärkt werden kann, und nachdem die größte Wahrscheinlichkeit besteht, daß auch das bei der Primärbestrahlung letzten Endes wirksame Agens die β-Strahlen sind, tritt die weitere Frage auf, wie diese freien Elektronen weiterhin zur biologischen Wirkung gelangen. Wenn, wie in unseren Prodigiosusversuchen die Elektronenstrahlung allein wirksam ist, während die Wellenstrahlung keinen Effekt hat, so ist anzunehmen, daß bei ersteren der Grund für ihre Wirksamkeit in Eigenschaften liegt, die den Wellenstrahlen nicht zukommen. Diese Eigenschaften aber sind: 1. sie haben eine Masse, d. h. ein $mv^2/2$, 2. sie können ihre Energie in beliebigen Teilbeträgen an die Umgebung abgeben, 3. sie haben eine Ladung.

Fassen wir letzteren Punkt näher ins Auge, so liegt es nahe, an jene Vorgänge zu denken, die der Ausdruck von bedeutungsvollen und teilweise bekannten physikalisch-chemischen Vorgängen in der Zelle sind. Zu solchen Vorgängen gehören in erster Linie die elektrischen

Erscheinungen. Wenn überhaupt im Wirkungsmechanismus der Röntgenstrahlen Veränderungen der elektrischen Verhältnisse im Sinne von Ladungsverschiebungen vorkommen, so können diese betreffen 1. die kolloidalen Teilchen, 2. die Phasengrenzen und Membranen.

Auf die Möglichkeit einer Umladung der kolloidalen Teilchen hat wohl als erster *Bordier* (4) aufmerksam gemacht. *Fernau* und *Pauli* (5), sowie *Wels* (6) haben an verschiedenen Kolloiden Trübung und Flockung nach Radiumbestrahlung beobachtet. Jedoch läßt sich für die Veränderungen an Kolloiden durch Röntgen- und Radiumstrahlen nicht eine Umladung allein verantwortlich machen. Sicher spielen auch andere, und zwar chemische Veränderungen eine gewisse Rolle: Dissoziation bei Eiweißen [*Loeb* (7), *Pauli* (8)], Quellung [*Schick* und *Martin* (9), *Schaudinn* (10)]. Wenn eine Ladungsveränderung der Kolloide statthat, so müssen wir auch eine Veränderung der elektrokinetischen Erscheinungen beobachten können.

Sollte aber andererseits durch die Elektronenstrahlung eine Ladungsverschiebung auf die Membranen zustande kommen, so müßten auch die dort auftretenden Potentialdifferenzen eine Änderung erfahren. Diese Frage zu entscheiden, ob nämlich die im lebenden Gewebe vorkommenden elektromotorischen Kräfte unter Bestrahlung verändert werden, war der Zweck der folgenden Versuche. Es lassen sich nämlich diese Potentiale als Potentialdifferenzen in übersichtlichen Modellen doch wenigstens in einiger Annäherung experimentell reproduzieren und zwar in Form der verschiedenen metallosen, stromgebenden Ketten

Dieser Weg der Untersuchung schien auch aus folgendem Grunde aussichtsreich. Die Ladungsänderung einer Membran müßte auch durch Änderung der Adsorption oder dergleichen eine Änderung der Permeabilität zur Folge haben. Daß aber wirklich Durchlässigkeitsänderungen von Membranen vorkommen, dafür haben wir Anhaltspunkte; 1. ist es *Holthusen* (11) gelungen, durch sehr hohe Strahlendosen die in Agar suspendierten Erythrocyten zu hämolysieren; 2. hat *E. A. Schmidt* (12) sowie *Ellinger* und *Landsberg* (13), *Cramer* (14) eine Veränderung der Aufnahmefähigkeit lebender Zellen für Vitalfarbstoffe beobachtet; 3. haben *Straub* und *Meyer* (15) gefunden, daß sich die Unstetigkeit in der CO_2-Bindungskurve der Erythrocyten bei Bestrahlung verschiebt. Daraus schließen die beiden Autoren auf eine Entladung der Phasengrenze. 4. *Lieber* (16) (17) (18) (19) hat in verschiedenen Arbeiten gezeigt, daß sich die Verteilung der K und Ca in der Haut der Ratte nach Bestrahlung grundsätzlich und entgegengesetzt ändert. Daraus schließt er ebenfalls auf eine Veränderung der Zellpermeabilität und glaubt, daß der Schwerpunkt der Röntgenstrahlenwirkung auf einer Verschiebung der Donnangleichgewichte liege. 5. Beim Morbus Basedowi ist die Leitfähigkeit der Haut erhöht. Es ist möglich, daß der Grund für diese Erscheinung in einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembranen für Ionen zu suchen ist. Wir wissen aber andererseits, daß die Basodowhaut äußerst röntgensensibel ist. Es wäre denkbar, daß für das Zustandekommen bestimmter Erscheinungen (Erythem) eine bestimmte Permeabilitätserhöhung nötig wäre. Diese Erhöhung würde bei der Zelle der Basedowhaut deshalb durch Bestrahlung eher erreicht sein, weil deren Membran schon eine vorher erhöhte Permeabilität aufweist.

In Anbetracht dieser Tatsachen habe ich versucht, eine eventuelle Durchlässigkeitsänderung direkt nachzuweisen. Die Wände der Spirogyren sind für Strychninnitrat durchlässig. Dringt das Alkaloid in die Zelle ein, so bildet es mit den Gerbsäuren des Zellsaftes gerbsaure Salze, die als braune Körner ausfallen und im Mikroskop deutlich sichtbar werden. Die Bildung dieser Körner beginnt erst bei einer bestimmten Konzentration. Diese Grenzkonzentration läßt sich ziemlich genau festlegen. Würde nun durch Bestrahlung die Wand der Spirogyrazelle die Durchlässigkeit für Strychnin ändern, so müßte dies in einer Verschiebung der Grenzkonzentration oder einer Änderung des zeitlichen Auftretens der Tannatkörner zum Ausdruck kommen. Aber weder das eine noch das andere wurde gegenüber den unbestrahlten Kontrollen irgendwie verändert gefunden.

Es wurden auch diesbezügliche Versuche an isolierten Froschsartorien ausgeführt. Ich nahm die Gewichtskurve von bestrahlten und nicht bestrahlten Sartorien, die in iso-, hypo- und hypertonischer NaCl-Lösung lagen, auf. Durch die Bestrahlung ist die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme oder -abgabe nicht verändert worden. Es ist jedoch wohl denkbar, daß eventuelle Ausschläge im Fehlerbereich der Ablesung dieser Versuche gelegen wären und deshalb nicht hätten wahrgenommen werden können.

Nach diesem kleinen Exkurs möchte ich zurückkommen auf die Untersuchungen der elektrischen Verhältnisse.

Ich habe eingangs hervorgehoben, daß die Röntgenstrahlenwirkung vorerst relativ homogen verteilt sein kann, und ich glaube, daß dies für die β-Strahlenemission noch zutrifft. Jedenfalls ist sie es in bezug auf die Zelle als Ganzes. Denn es ist anzunehmen, daß im ganzen Bereich der Zelle Elektronen emittiert werden. Und zwar müssen dieselben sowohl an Zahl (Intensität) als auch an Geschwindigkeit (Qualität, Härte) überall ungefähr gleich sein, weil ja diese beiden Größen neben der Qualität und Intensität der Primärstrahlung, die überall im Bereiche der Zelle gleich ist, nur von der Ordnungszahl der sie emittierenden Atome abhängig ist.

Zum überwiegend größten Teil besteht aber das Gewebe aus H, C, O, deren Z mit 1, 6, 8 nahe beieinander liegen. 7 N, 15 P, sowie 11 Na, 12 Mg, 16 S, 17 Cl, 19 K, 20 Ca und 26 Fe kommen praktisch für diese Betrachtung nicht in Frage, weil ihre Konzentration in der Zelle zu gering ist. Daneben ist zu bemerken, daß diese höher geordneten Elemente wohl ebenfalls homogen in der Zelle verteilt sind.

Nun ist es aber, wie gesagt, denkbar, daß die gleichmäßig verteilten freien Elektronen an bestimmten Stellen aus irgend einem Grunde zu einer für das Leben der Zelle besonders bedeutungsvollen Wirkung kommen. Z. B. dadurch, daß sie an diesen Stellen eine Ladungsänderung herbeiführen. Jede lokalisierte Ladungsänderung hat wohl aber eine Änderung der dort vorkommenden Potentiale zur Folge. Die in der lebenden Zelle möglichen Potentiale sind aller Wahrscheinlichkeit nach: 1. Diffusionspotentiale, 2. Phasengrenzpotentiale, 3. Membranpotentiale, 4. Adsorptionspotentiale; sicher sind es keine 5. Elektrodenpotentiale.

Ich habe deshalb Modelle dieser Potentiale den Röntgenstrahlen ausgesetzt und ihre Größe vor, während und nach der Bestrahlung verfolgt.

Die Potentialdifferenzen sind in Kompensationsschaltung mit dem Kapillarelektrometer als Nullinstrument und einem Leclanchéelement als Arbeitsstromquelle gemessen worden. Als Vergleichs-EMK diente ein Weston-Normalelement mit 1018 mV Klemmenspannung. Die Ableitung der Kettenpotentiale wurde in der von *Michaelis* und *Fujita* (20) angegebenen Weise, mittels KCl-Agarhebern bewerkstelligt, und zwar auf zwei identische gesättigte KCl-Kalomelelektroden. Dieselben ergaben gegenüber der mit n/10 Standardacetat gefüllten H_2Pt-Elektrode bei 16° C Potentialdifferenzen von 513 bzw. 514 mV. Die Fehlergrenzen der Kompensationsschaltung schwankten je nach Widerstand der Kette zwischen $\pm$ 0,15 und $\pm$ 0,3 mV. Die Fehler der Elektroden und Leitungen fielen in ein und demselben Versuch außer Betracht. Dennoch wurde an jedem Versuchstage die Spannung der gegeneinander geschalteten Elektroden gemessen und konstant zu 1 mV (514—513) gefunden. Als Strahlenquelle diente eine mit der Gaiffe-Apparatur betriebene Glühkathodenröhre. Die Röhrenspannung von 200 kV, die Belastung von 4 mA, die Fokusobjektdistanz von 38 cm, die Feldgröße von 60 : 80 mm, sowie die Filterung von 0,5 mm Al wurde während allen Versuchen konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen erreichten wir die Oberflächendosis einer H. E. D. in 18 Minuten.

Versuchsresultate.

In jeder Versuchsgruppe sind mehrere Versuche ausgeführt worden. Da kein einziger abweichend ausgefallen ist, gebe ich von jeder Gruppe nur ein Protokoll mit der dazugehörigen Potentialkurve. Zwei benachbarte Pfeile in der Kurve, zwischen denen die Bezeichnung Rö. steht, geben Anfang und Ende einer Bestrahlung an. Entsprechende Bezeichnungen mit R. s. r. bedeuten Kontrollversuch: die Röhre ist in Betrieb, aber der primäre Strahlenkegel ist durch dickes Bleiblech abgeblendet.

I. Diffusionskette.

(Freie Diffusion in Wasser, m/500 HCl gegen konz. HCl.)

Werden in einem, in bezug auf Zusammensetzung inhomogenen Elektrolyten zwei räumlich auseinander gelegene Punkte zu einem Elektrometer abgeleitet, so zeigt sich zwischen diesen Punkten eine Potentialdifferenz. Die Verschiedenartigkeit der Zusammensetzung kann entweder bedingt sein durch verschiedene Konzentration ein und desselben Elektrolyten oder durch verschiedene Elektrolyte in gleicher oder verschiedener Konzentration. Ich habe eine einfache HCl-Diffusionskette untersucht. Ein beiderseits offener Glaszylinder ist in eine Schicht von gesättigtem KCl-Agar, die den Boden eines Becherglases belegt, mit einem Ende eingegossen. Auf den KCl-Agarboden wird in den Glaszylinder konzentrierte HCl gegeben und darauf

vorsichtig m/500 HCl aufgeschichtet. Oben wird die verdünnte HCl in der gegebenen Weise direkt abgeleitet. Unten aber wird die Ableitung der konzentrierten HCl über den KCl-Agarboden und der darübergeschichteten gesättigten KCl-Lösung bewerkstelligt.

Die EMK dieser Kette ist gegeben durch die *Nernst*sche Formel:

$$\pi = \frac{u - v}{u + v} \cdot \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{c_1}{c_2} \quad (\textit{Nernst}\ 21,\ 22,\ 23).$$

Für unseren Fall sollte $\pi = 134$ mV sein. Da dieser Wert nur bei idealer Berührung der beiden Konzentrationen erreicht werden kann — dies ist bis dahin am besten in den Versuchsanordnungen von *Fujita* (24) und *Lamb* und *Larson* (25) möglich —, so ist es nicht verwunderlich, wenn die gemessenen EMK zu klein sind. Die Diffusion tritt ziemlich rasch ein, so daß eine absinkende Spannungskurve resultiert.

Es sei die unregelmäßigste Kurve, die ich in dieser Versuchsgruppe aufgenommen habe, mit dem dazugehörigen Protokoll gegeben. Eine Beeinflussung derselben durch die Röntgenstrahlen konnte nicht festgestellt werden.

Datum	Zeit	mV	Bemerkungen	Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
28. IX.	17h30'	66,0		28. IX.	17h48'	56,0	
	31	65,2			49	55,8	
	32	64,2			50	54,5	
	33	63,3			51	54,2	
	35	62,5			52	54,2	Rö.
	36	61,2	Rö.		53	54,0	
	37	60,5			54	53,2	
	39	59,2			55	52,8	ex
	41	58,5	ex		56	52,3	
	42	58,4			57	51,6	
	43	57,2			58	51,1	
	43,5	57,0			59	50,8	
	44	57,2	Rö.		18 00	50,4	
	45	57,1					
	46	56,4					
	47	55,8	ex				

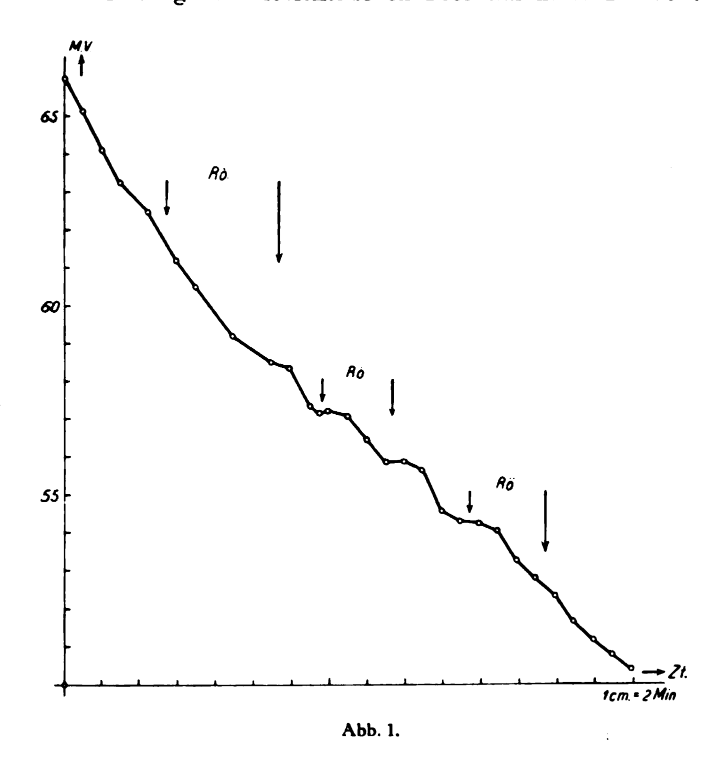


Abb. 1.

II. Ölketten.

An den Grenzen zweier Phasen entsteht im allgemeinen eine Potentialdifferenz. Diese ist bedingt durch die Verteilung der gelösten Elektrolyte in den beiden Lösungsmitteln [*Nernst* (l. c.), *Haber* (26), *Haber* und *Klemensiewicz* (27), *Beutner* (28)]. Ich habe NaCl gegen Dimethylanilin-HCl bzw. Na-Oleat sowohl in Guajakol als auch in o-Toluidin untersucht.

Einerseits NaCl, andererseits Dimethylanilin-HCl wird mit Guajakol bis zur endgültigen Verteilung ausgeschüttelt und vorsichtig in ein U-Rohr eingetragen. Auf den Dimethylanilin-HCl-Schenkel wird wässerige m/10 Dimethylanilin-HCl-Lösung, auf den Chloridschenkel wässerige m/10 NaCl-Lösung aufgeschichtet. Diese Kette enthält Cl-Ionen durchgehend. Es ist eine für Cl-Ionen reversible Kette, die durch das Schema:

—	m/10 Dim. An. HCl in Wasser	Dim. An. HCl in Guajakol	NaCl in Guajakol	m/10 NaCl in Wasser	+

dargestellt wird. Da im Dimethylanilin-HCl-Schenkel die Konzentration der negativ geladenen Cl-Ionen bedeutend größer ist als im anderen, wird derselbe zum negativen Pol der Kette.

Bauen wir eine Kette auf von der Form:

+ m/10 Na-Oleat in Wasser	Na-Oleat in Guajakol	NaCl in Guajakol	m/10 NaCl in Wasser —

so haben wir darin eine für Na-Ionen reversible Kette, das Na-Ion ist durchgehend. Im Oleatschenkel befinden sich mehr positiv geladene Na-Ionen, so daß dieser Schenkel zum positiven Pol wird.

Guajakol ist ein saures Öl. Verwenden wir statt des Guajakols o-Toluidin, das basischen Charakter hat, zur Anlegung der Ölkette, so kehren sich die Pole um. Die Cl-Ionen reversible Kette:

+ m/10 Dim. An. HCl in Wasser	Dim. An. HCl in Toluidin	NaCl in Toluidin	m/10 NaCl in Wasser —

hat also negativen NaCl-Schenkel. Die Na-Oleatkette:

— m/10 Na-Oleat in Wasser	Na-Oleat in Toluidin	NaCl in Toluidin	m/10 NaCl in Wasser +

gibt, mit o-Toluidin angesetzt, einen positiven Chloridschenkel.

A. NaCl gegen Dimethylanilin-HCl (Cl-Ionen reversibel).

1. In Guajakol (saures Öl).

Datum	Zeit	mV	Bemerkungen	Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
28. VIII.	14h35'	84,7		28. VIII.	16h04'	85,0	
	50	84,8			10	85,0	
	55	84,7			30	85,4	
	15 15	84,6			36		Rö.
	20		Rö.		38	86,8	
	24	86,2			42	86,8	
	28	86,5			45	86,9	ex
	31	86,5					
	35	86,5	ex		50	85,6	
					54	85,5	
	40	84,8			17 05	85,5	
	45	84,8					
	50	84,9			08	85,3	Rö. sine rad.
					13	85,4	ex
	55	85,0	Rö. sine rad.				
	57	85,2			15	85,3	
	16 00	85,2	ex		25	85,6	

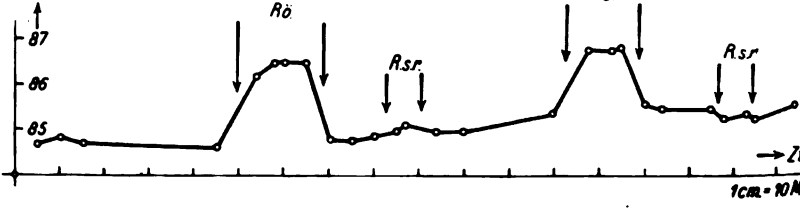


Abb. 2.

2. In o-Toluidin (basisches Öl).

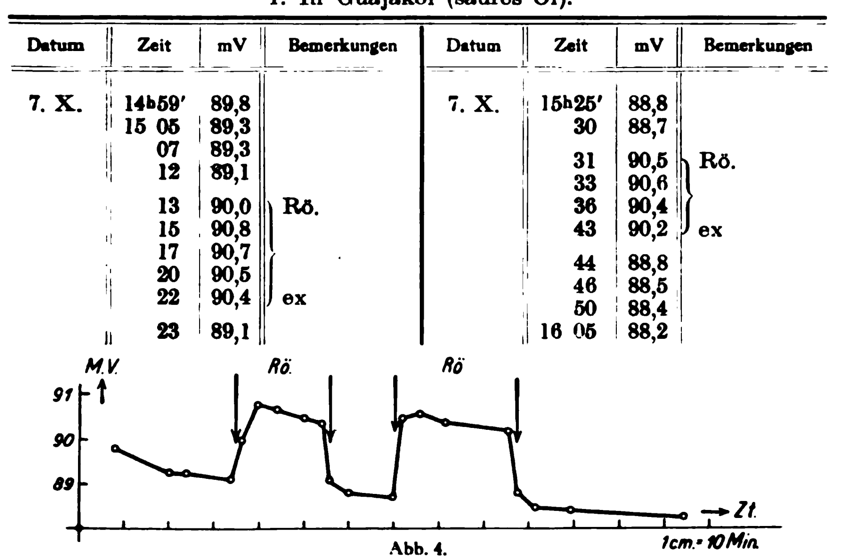
Datum	Zeit	mV	Bemerkungen	Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
1. IX.	—	31		2. IX.	$15^h38'$	52,9	Rö. sine rad.
2. IX.	$15^h08'$	53,8			40	52,9	ex
	17	53,5			41	52,7	
	19	53,2			45	52,6	
	21	54,3	Rö.		48	54,0	Rö.
	24	54,7			50	54,5	
	28	56,0			52	54,0	ex
	32	55,5			54	51,8	
	33	55,7			58	51,7	
	35		ex				
	35	52,8					
	36	52,8					

M.V. Rö. Rö. R.s.r. Zt.

Abb. 3. 1cm = 10 Min.

B. NaCl gegen Na-Oleat (Na-Ionen reversibel).

1. In Guajakol (saures Öl).



Datum	Zeit	mV	Bemerkungen	Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
7. X.	$14^h59'$	89,8		7. X.	$15^h25'$	88,8	
	15 05	89,3			30	88,7	
	07	89,3			31	90,5	Rö.
	12	89,1			33	90,6	
	13	90,0	Rö.		36	90,4	
	15	90,8			43	90,2	ex
	17	90,7			44	88,8	
	20	90,5			46	88,5	
	22	90,4	ex		50	88,4	
	23	89,1			16 05	88,2	

Abb. 4.

2. In o-Toluidin (basisches Öl).

Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
18. IX.	16h40'	109,8	
	45	114,5	
	50	113,0	
	55	113,1	
	56	113,3	Rö.
	58	115,5	
	17 00	116,1	
	03	116,5	
	04	116,8	ex
	06	114,0	
	09	114,1	
	11	114,1	

Abb. 5.

Wie ersichtlich, zeigt sich eine Erhöhung der EMK durchgehend.

III. Konzentrationsketten.

Wenn zwei wässerige Phasen mit verschiedenen Konzentrationen ein und desselben Elektrolyten durch eine Ölschicht getrennt werden, so stellt diese Anordnung wieder eine Kette dar, deren EMK zwischen Null und dem Werte der *Nernst*schen Formel schwankt.

Größe und Sinn der Potentialdifferenz ist neben den Konzentrationen abhängig von der Art des öligen Mittelleiters und von der Art des gemeinschaftlichen Ions. *Cremer* (29) hat als Mittelleiter nicht Öl, sondern eine äußerst dünne Glaswand benutzt. Es hat sich gezeigt, daß, da offenbar

Glas H- und OH-Ionen gebunden enthält, diese Anordnung eine für H-Ionen reversible Kette darstellt. Sie ist eine Wasserstoffionenkonzentrationskette.

Ein Reagenzglas wird zu einem äußerst dünnwandigen Ballon ausgeblasen. In den Ballon habe ich m/500 HCl gegeben und denselben in m/500 NaOH getaucht. Diese

A. *Cremer*sche Glaskette

gibt eine Spannung von etwa 0,5 Volt. Aus dem folgenden Protokoll mit dazugehöriger Kurve ist die Beeinflussung dieser Spannung ersichtlich:

Datum	Zeit	mV	Bemerkungen	Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
30. IX.	14h25'	336,2		30. IX.	15h39'	339,5	Rö.
	40	336,0			40	340,0	
	50	336,1			43	340,2	
	15 00	336,2			48	340,2	
	08	336,0			53	340,0	ex
	10	338,5	Rö.		54	337,5	
	13	340,0			56	336,2	
	16	339,8			00	336,0	
	20	340,0	ex		16 06	336,2	
	21	336,5			07	336,3	Rö. sine rad.
	22	336,0			08	336,5	
	25	336,2			10	336,3	ex
	38	336,0			17	336,2	
					22	336,3	

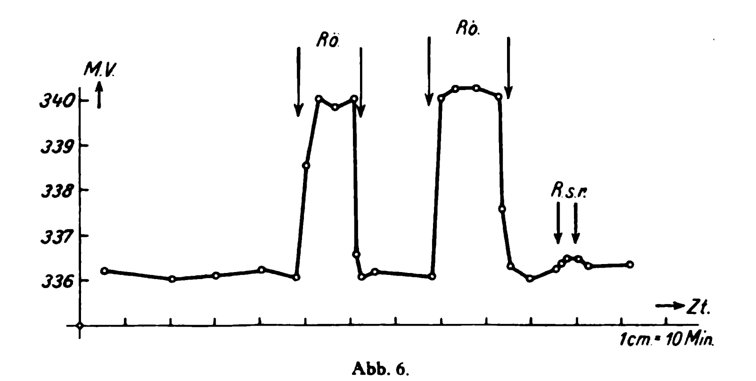


Abb. 6.

B. Ferrocyankupfermembran.

Gießen wir in ein beiderseits offenes Glasrohr m/40 $K_4Fe(CN)_6$-Lösung, der 10proz. Gelatine zugesetzt ist, und tauchen wir diesen Zylinder in m/20 $CuSO_4$-Lösung, so bildet sich an der Berührungsstelle des gelatinierten Ferrocyankaliums mit dem Kupfersulfat eine Ferrocyankupfermembran. Leiten wir aus Kupfersulfat direkt und aus $K_4Fe(CN)_6$-Gelatine vermittelst überschichteter gesättigter KCl-Lösung zur Kompensationsschaltung ab, so messen wir im Scheitelpunkt der Spannungskurve eine EMK von 125 bis 136 mV. Der positive Pol ist das Kupfersulfat.

Die Entstehung dieser EMK ist auf folgende Weise erklärlich. *Beutner* (l. c.) hat nachweisen können, daß die $Cu_2Fe(CN)_6$-Membran nur für Kationen, also auch für Kalium durchlässig ist. Auf der $K_4Fe(CN)_6$-seite besteht eine hohe K-Ionenkonzentration. Aber auch im Kupfersulfat befinden sich K-Ionen, allerdings in bedeutend geringerer Menge, nämlich nur so viel, als dem Umsatz:

$$K_4Fe(CN)_6 + 2\,CuSO_4 = Cu_2Fe(CN)_6 + 2\,K_2SO_4$$

entspricht. Diese Kette ist für Kaliumionen reversibel.

Ich gebe eine Kurve mit Protokoll, die, wie ersichtlich, durch Röntgenbestrahlung unbeeinflußt blieb.

Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
3. IX.	17h07′	—	Ansetzen
	14	129,0	
	17	130,2	
	20	131,2	
	25	131,2	
	27	131,0	
	29	131,0	Rö.
	31	130,6	
	34	130,1	
	36	129,8	ex
	37	129,3	
	43	128,5	
	50	125,5	

Abb. 7.

IV. Kollodiummembran (Donnangleichgewicht).

Eine auf übliche Weise hergestellte, nicht ausgetrocknete Kollodiumhülse wurde innen mit 1proz. Gelatine + m/2000 HCl beschickt, in eine m/2000 HCl-Lösung getaucht und von beiden Seiten zum Elektrometer abgeleitet. Dabei tritt eine Spannung von 15 bis 16 mV auf. Ich gebe Protokoll und Kurve eines solchen Versuchs wieder.

Datum	Zeit	mV	Bemerkungen
15. IX.	16h00′	15,6	
	05	15,1	
	07	15,1	
	08	15,2	Rö.
	10	15,2	
	13	15,3	
	15	15,2	
	18	15,1	
	23	15,1	
	24	15,0	
	36	14,9	ex
	37	14,9	
	48	14,5	

Abb. 8.

Auch hier bleiben die Ausschläge bei der Bestrahlung aus.

Kurz zusammengefaßt, ergab sich also eine Änderung der Potentialdifferenz bei den Ölketten und der *Cremer*schen Glaskette; sie blieb aus bei der freien Diffusion in Wasser, der Ferrocyankupfermembran, der nicht ausgetrockneten Kollodiummembran.

Die Potentialerhöhung tritt sofort nach Beginn der Bestrahlung ein und wird sofort nach der Sistierung derselben rückgängig.

Eine sichere Erklärung dieser meiner Resultate ist heute schwer zu geben. Und dennoch will ich einen Versuch machen. Es ist zu erklären: 1. warum im Falle der Öl- und Glaskette eine Beeinflussung der EMK eintritt, und 2. warum das Potential bei freier Diffusion, bei der Ferrocyankupfer- und Kollodiummembran nicht geändert wird.

Die Größe der Spannung einer Diffusionskette ist theoretisch gegeben durch die *Nernst*sche Formel:

$$\pi = \frac{u-v}{u+v} \cdot \frac{R.T}{F} \cdot \ln \frac{c_1}{c_2}.$$

Wird die Kette bestrahlt $(+ v . h)$ und ändert sich dabei die EMK, so kann dies nur durch Änderung von u und v geschehen, denn R, T, F = const. Ebenso wird c_1 und c_2 nach den Untersuchungen von *Janitzki* (30) nicht beeinflußt. Derselbe konnte zeigen, daß die Leitfähigkeit bei Bestrahlung sich nicht ändert. Es ist also:

$$\pi = f(u, v).$$

Es ist nun leicht einzusehen, daß durch Ladungsänderungen einer Membran, z. B. durch Entladung durch freie Elektronen, eine Beeinflussung der Ionenbeweglichkeiten u und v zustande kommt. Und zwar in dem Sinne, daß die Anionen gehemmt und die Kationen beschleunigt würden. Ähnlich wie eine Gitterladung im Elektronenrohr den Elektronenstrom steuert. Warum tritt aber dieser Effekt das eine Mal auf, das andere Mal nicht?

Möglicherweise spielt hierbei die Dielektrizitätskonstante eine gewisse Rolle [*Hafner* (31)]. Aber *Leonor Michaelis* (32) referiert im dritten Heft der Naturwissenschaften 1926 eine Reihe von Arbeiten, die er zusammen mit *Fujita* (20) (33) (34) (35) und *Tokan* ausgeführt hatte. Er gibt zum Schluß eine allgemeine Theorie der Membranpermeabilität, die geeignet ist, meine Befunde zu erklären, und die kurz folgendes besagt:

Membranen sind Siebe. Verschiedene Membransiebe haben verschieden große Poren. Für die Permeabilität einer Membran kommt aber nicht nur die Porenweite oder besser gesagt das Verhältnis derselben zum Teilchendurchmesser der permeierenden Stoffe in Betracht, sondern auch die elektrischen Verhältnisse der Membran, ihre Ladung. Diese letztere ist nur für elektrisch geladene Teilchen von Bedeutung, für die Ionen. Die Ladung der Membran — ganz ungeachtet wie dieselbe zustande kommt — hat einen um so größeren Einfluß auf die diffundierenden Ionen, je kleiner die Poren sind. Und zwar deshalb, weil offenbar nur die wandständigen Teilchen elektrostatisch beeinflußt werden. Es gibt nun Membranen, die sich durch Elektrolyte umladen lassen. *Michaelis* konnte an Hand von potentiometrischen Beobachtungen nachweisen, daß durch diese Umladung nicht nur die absolute Größe der Ionenwanderungsgeschwindigkeiten, sondern auch das relative Verhältnis von u und v beeinflußt wird. Dadurch erhält die Membran einen gegenüber dem Potential bei freier Diffusion im allgemeinen positivierenden Effekt auf die EMK. Diese Wirkung ist aus obigem Grunde um so größer, je kleiner die Membranporen sind. Warum sollte nun nicht auch eine Umladung durch Elektronen den gleichsinnigen und ähnlich von der Porengröße abhängigen Effekt haben.

Dies scheint denn auch nach meinen Versuchen der Fall zu sein, denn *Michaelis* konnte weiter zeigen, daß die Ferrocyankupfer- und die nicht ausgetrocknete Kollodiummembran weite Poren haben. Bei ihnen tritt gegenüber der freien Diffusion in Wasser ein geringer positivierender Effekt auf. Aber eben diese beiden Membranen haben auch bei meiner Versuchsanordnung keinen Ausschlag gegeben. Dagegen gibt das Glas Membranen mit sehr feinen Poren. Dies stimmt mit meinen Befunden

überein; ich habe an den Glasketten die größten Ausschläge beobachtet (bis 5,5 mV).

Die Ölketten möchte ich deshalb hier aus der Diskussion weglassen, weil sie von *Michaelis* noch nicht studiert worden sind. Jedoch scheint auch hier ein ähnlicher Mechanismus wirksam zu sein.

Wie die Kurven der Versuchsreihe 1 und 2 zeigen, sind die Veränderungen der EMK, wie ich sie dort durch Röntgenbestrahlung erhalten habe, *zeitlich* mit der Bestrahlung *identisch*. Ich bin mir deshalb wohl bewußt, daß dieselben nicht den einzigen und letzten Grund all der verschiedenartigen *bleibenden* Veränderungen, die die Röntgenstrahlen im lebenden Gewebe setzen, darstellen. Dennoch glaube ich, daß meine Befunde nicht nur für das Verständnis der biologischen Strahlenwirkungen, sondern auch für die Theorie der Membranen und der stromgebenden Ketten von einiger Bedeutung sein dürften.

Die von *Lieber* und anderen geäußerste Ansicht, daß die Röntgenstrahlenwirkung vornehmlich in einer Beeinflussung der Permeabilität der Zellmembran besteht, wird durch obige Untersuchungen experimentell gestützt.

Literatur.

1) *Liechti*, Klin. Wochenschr. 19, 825, 1924. — 2) *Holthusen*, Fortschr. d. Röntgenstrahlung 33, 62, 1925, Kongreßheft. — 3) *Liechti*, Klin. Wochenschr., März 1926. — 4) *Bordier*, Strahlenther. 2, 368, 1913. — 5) *Fernau* und *Pauli*, diese Zeitschr. 70, 1915. — 6) *Wels*, Pflügers Arch. 199, 226, 1923. — 7) *Loeb*, Naturwiss. 1924, S. 213. — 8) *Pauli*, Klin. Wochenschr. 1, 1, 1924. — 9) *Chick* und *Martin*, Kolloidchem. Beihefte 5, 49, 1923. — 10) *Schaudinn*, Pflügers Arch. 77, 29, 1899. — 11) *Holthusen*, Strahlenther. 14, 561, 1922. — 12) *Schmidt*, ebendaselbst 12, 517, 1921. — 13) *Ellinger* und *Landsberg*, Klin. Wochenschr. 1923. — 14) *Cramer*, Klin. Wochenschr. 1926, 190. — 15) *Straub* und *Meyer*, diese Zeitschr. 139, 302, 1923. — 16) *Lieber*, Wien. klin. Wochenschr. 39, 197, 1924. — 17) *Derselbe*, Zeitschr. f. Krebsforsch. 21, 1924. — 18) *Derselbe*, Strahlenther. 20, 1925. — 19) *Derselbe*, Fortschr. d. Röntgenstr. 33, 73, 1925, Kongreßheft. — 20) *Michaelis* und *Fujita*, Zeitschr. f. phys. Chem. 110, 266, 1924. — 21) *Nernst*, ebendaselbst 4, 129, 1889. — 22) *Derselbe*, ebendaselbst 2, 611, 1888. — 23) *Derselbe*, ebendaselbst 9, 140, 1892. — 24) *Fujita*, diese Zeitschr. 159, 370, 1925. — 25) *Lamb* und *Larson*, Journ. of the Amer. Chem. Soc. 42, 229, 1920. — 26) *Haber*, Ann. d. Phys. 26, 927, 1908. — 27) *Haber* und *Clemensievicz*, Zeitschr. f. phys. Chem. 67, 385, 1909. — 28) *Beutner*, Die Entstehung elektrischer Ströme im lebenden Gewebe. Stuttgart 1920. — 29) *Cremer*, Zeitschr. f. Biol. 47, 1, 1906. — 30) *Janitzki*, Zeitschr. f. Physik 20, 280, 1923. — 31) *Hafner*, Ergebn. d. Physiol. 24, 566, 1925. — 32) *Michaelis*, Naturwiss. 3, 1926. — 33) *Fujita*, diese Zeitschr. 158, 11, 1925. — 34) *Michaelis* und *Fujita*, ebendaselbst 158, 28, 1925. — 35) *Dieselben*, ebendaselbst 161, 47, 1925. — 36) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl. Berlin 1922. — 37) *Derselbe*, Praktikum der physikalischen Chemie. Berlin 1922. — 38) *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl. Leipzig 1922. — 39) *Bechhold*, Kolloide in Biologie und Medizin. Steinkopf 1919. — 40) *Zsigmondy*, Kolloidchemie. Leipzig 1925. — 41) *Meyer*, Lehrb. d. Strahlenther. 3. Wien 1925.

Über das Verhalten des p-Xylochinons zu Hefe.

Von

Carl Neuberg und **Ernst Simon.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Die drei Verbindungen der Vierkohlenstoffreihe *Diacetyl*, *Acetoin* und *2, 3-Butylenglykol* sind chemisch und physiologisch miteinander verknüpft: $CH_3 . CO . CO . CH_3 \leftarrow CH_3 . CHOH . CO . CH_3 \rightarrow CH_3 . CHOH . CHOH . CH_3$. Das Acetoin liefert durch Oxydation leicht Diacetyl und durch Reduktion β, γ-Dioxybutan. Das Diacetyl ist weiterhin dadurch ausgezeichnet, daß es einen markanten Übergang in die aromatische Reihe vermittelt. Es wird nämlich, wie *M. v. Pechmann*[1]) entdeckt hat, schon durch verdünntes Alkali unschwer zu *p-Xylochinon* kondensiert; dabei tritt als Zwischenprodukt[2]) das *Diacetyl-aldol* auf:

$$
\begin{array}{ccc}
CH_3.CO.CO.CH_3 & & CH_3.CO.C(OH).CH_3 \\
+ & \longrightarrow & | \\
CH_3.CO.CO.CH_3 & & CH_3.CO.CO.CH_2
\end{array}
$$

$$
\longrightarrow \begin{array}{c}
CH.CO.C.CH_3 \\
\| \qquad \| \\
CH_3.C.CO.CH
\end{array}
$$

Ferner haben *O. Diels* und *H. Jost*[3]) die interessante Beobachtung mitgeteilt, das ein *trimeres*, durch verdünnte Mineralsäure wieder zum monomolekularen Grundkörper aufspaltbares Diacetyl, $(CH_3 . CO . CO . CH)_3$, bei der Behandlung mit Natriumamalgam *p-Xylohydrochinon* liefert.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß unerwarteterweise Hefe unter den allerverschiedensten Bedingungen befähigt ist, aus Zucker und

---

1) *M. v. Pechmann*, Ber. **21**, 1418, 1888.

2) *M. v. Pechmann* und *E. Wedekind*, Ber. **28**, 1845, 1895.

3) *O. Diels* und *H. Jost*, Ber. **35**, 3290, 1902.

Acetaldehyd[1]) bzw. aus Brenztraubensäure und Acetaldehyd[2]) oder auch unter Beteiligung der Oxalessigsäure[3]) Acetoin und Butylenglykol zu bilden, haben wir einige Versuche darüber für wünschenswert gehalten, ob eine Rückverwandlung des zyklischen p-Xylochinons bzw. p-Xylohydrochinons in Körper der Butylenreihe möglich wäre.

Fügt man zu einer gärenden Zuckerlösung eine alkoholische Lösung von *p-Xylochinon*, so entfärbt sich, wenn das Xylochinon in kleinen Anteilen eingetragen wird, die gelbliche Flüssigkeit schnell. Beläßt man nach dem Eintragen allen Xylochinons die Mischung 2 Tage im Brutschrank, so nimmt die Flüssigkeit allmählich eine dunkelbraune Färbung an. Der Geruch nach p-Xylochinon ist verschwunden. Destilliert man nach dieser Zeit einen aliquoten Teil ab, so findet man in ihm kein Acetoin und kein Diacetyl vor, wohl aber *Acetaldehyd*. Dieser tritt im Vergleich mit entsprechenden normalen Gäransätzen in so verstärkter Menge auf, daß seine Bildung mit der Umwandlung des p-Xylochinons in unzweifelhaftem Zusammenhang stehen mußte. Der Acetaldehyd konnte entweder dem Chinon entstammen oder ein Oxydationsäquivalent für die Entstehung eines Reduktionsprodukts aus dem zugegebenen Xylochinon sein. Es handelt sich in der Tat um eine Reduktion des p-Xylochinons zum entsprechenden Hydrochinon. Aus dem durch Zentrifugieren vom Hefeschlamm getrennten Gärgut gewinnt man durch direktes Ausäthern das *p-Xylohydrochinon* in mehr als 90proz. Ausbeute.

Diese Umwandlung des p-Xylochinons in das Hydrochinon

```
         CO                     C(OH)
        /  \                    /  \\
      HC    C.CH3             HC    C.CH3
      ||    ||        -->     ||    |
  H3C.C     CH            H3C.C     CH
        \  /                    \  //
         CO                     C(OH)
```

ist ganz analog der von uns früher ausgeführten phytochemischen Reduktion nicht ringförmiger Diketone, z. B. des Diacetyls und Benzils[4]).

Daß diese Hydrierung mit dem Gärakt verknüpft ist und nicht durch reduzierende Faktoren der Hefeleibessubstanz bewirkt wird, ergibt sich, außer durch die bereits erwähnte verstärkte Erzeugung von

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **148**, 553, 1923; *C. Neuberg*, Die deutsche Zuckerindustrie **49**, 1054, 1924; *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschr. **156**, 364, 1925; *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **160**, 250, 1925; *A. J. Kluyver*, *H. J. L. Donkers* und *F. Visser t' Hooft*, ebendaselbst **161**, 375, 1925; *L. Elion*, ebendaselbst **169**, 471, 1926.

[2]) *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **131**, 178, 1922; *C. Neuberg* und *A. v. May*, ebendaselbst **140**, 299, 1923; *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, Ber. **57**, 1436, 1924.

[3]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **154**, 495, 1924; Ergebn. d. Physiol. **24**, 191, 1925.

[4]) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, Ber. **52**, 2248, 1919.

Acetaldehyd, aus dem Verhalten, das p-Xylochinon in Berührung mit abgekochter Hefe und Invertzuckerlösung zeigt. Bringt man p-Xylochinon, in Alkohol gelöst, mit einer Aufschwemmung von abgekochter Hefe in Wasser zusammen, wobei das schwerlösliche p-Xylochinon in feinster Verteilung wieder ausfällt, so nimmt der Gehalt an zyklischem Diketon bei längerem Stehen ab. Man kann nämlich aus dem 48 Stunden hindurch bei 37° digerierten Gemische das mit Wasserdampf leicht und quantitativ sich verflüchtigende p-Xylochinon nur rund zur Hälfte noch regenerieren. Vom zugehörigen p-Xylohydrochinon sind dabei lediglich Spuren nachzuweisen.

Daß ein erheblicher Teil des Chinons verschwindet, ohne in Hydrochinon umgewandelt zu werden, und dabei in undefinierte Produkte übergeht, beruht wohl auf einer Reaktion des Chinons mit den stickstoffhaltigen Bestandteilen der Hefezellen. *E. Fischer* und *H. Schrader*[1]) haben gezeigt, daß Chinon mit Aminosäure-estern zu Kondensationsprodukten zusammentritt; *L. Meunier* und *A. Seyewetz*[2]) haben dasselbe hinsichtlich einer Reaktion von Chinon mit genuinem Eiweiß angegeben. Ferner muß man sich der Möglichkeit einer Reaktion zwischen Aminosäuren und Chinonen erinnern, deren Entdeckung man *W. Traube*[3]) verdankt, wenngleich die typische Umsetzung [siehe Kontrollen a) und b)] im vorliegenden Falle nicht in Frage kommt.

Belege.

a). 100 g Rohrzucker wurden in 1 Liter Leitungswasser gelöst und noch 40° warm mit 100 g gut abgepreßter Unterhefe (Schultheiss-Patzenhofer) zur Angärung gebracht. Darauf erfolgte anteilweise die Zugabe von 2.5 g p-Xylochinon, die in heißem reinen Alkohol gelöst waren. Der Zusatz wurde derart geregelt, daß die Gärung nie in Stillstand geriet; es trat jeweils nur eine Schwächung der Kohlensäureentwicklung sowie geringe Verfärbung auf, die jedoch bald wieder zurückging Am nächsten Tage wurden nochmals 50 g Zucker in 500 ccm Wasser sowie 50 g Hefe zugesetzt und nach dem Eintreten lebhafter Gärung die restliche Xylochinonlösung nachgegeben. Das Gärgemisch, das im Thermostaten bei 37° aufbewahrt worden war, wies nunmehr eine dunkle, bräunliche Färbung auf. Eine abzentrifugierte Probe zeigte nur noch minimale Linksdrehung; der Zucker war demnach praktisch vergoren, so daß zur Aufarbeitung geschritten werden konnte. Das Gesamtvolumen des Gärguts betrug 2000 ccm. Nach Entfernung des Hefeschlamms durch Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit mehrere Male ausgeäthert. Die ätherischen Auszüge wurden mit Knochenkohle behandelt und filtriert. Der Äther wurde verdampft und der Rückstand in ein Kristallisierschälchen übergeführt, das bis zur völligen Trocknung im Vakuumexsikkator belassen wurde. Die letzten Spuren Feuchtigkeit wurden über

[1]) *E. Fischer* und *H. Schrader*, Ber. **43**, 525, 1910.

[2]) *L. Meunier* und *A. Seyewetz*, Chem. Centralbl. **1914**, II, **672**; vgl. ferner *G. T. Morgan* und *E. A. Cooper*, ebendaselbst **1925**, I, **1215**; *S. Hilpert*, diese Zeitschr. **166**, 80, 1925.

[3]) *W. Traube*, Ber. **44**, 3146, 1911.

Phosphorpentoxyd entfernt. Die noch etwas braun gefärbte Kristallmasse wog 2,1230 g, was einer Rohausbeute von 84,9 Proz., auf Xylochinon berechnet, gleich kommt.

Zur völligen Reindarstellung wurde das Produkt in heißem Wasser gelöst, unter Einleiten von Kohlensäure sowie Zusatz von etwas Knochenkohle zum Sieden gebracht und filtriert. Beim Erkalten schied sich das p-Xylohydrochinon in rein weißen, filzigen Nädelchen ab, die auf der Nutsche abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und in vacuo getrocknet wurden. Die Kristalle zeigten den Schmelzpunkt 212°, der in der Literatur[1]) für das auf rein chemischem Wege gewonnene Produkt angegeben ist. Für die intermediäre Bildung von Chinhydron, das ja auch aus den Komponenten in vitro nicht entsteht[2]), waren keine Anzeichen vorhanden.

b). In einem anderen, unter gleichen Bedingungen ausgeführten Versuch wurden 93,3 Proz. des p-Xylochinons in das Hydroderivat umgewandelt. Das Vorliegen dieser Substanz wurde ferner durch die Elementaranalyse erwiesen:

0,1658 g Substanz: 0,4207 g CO_2; 0,1122 g H_2O.
$C_8H_{10}O_2$. Ber.: C = 69,55 Proz.; H = 7,25 Proz.
Gef.: C = 69,20 „ ; H = 7,52 „ .

Das *p-Xylohydrochinon* besaß folgende Eigenschaften: Versetzte man die wässerige Lösung der Substanz mit Eisenchlorid und erhitzte zum Sieden, so trat der charakteristische, stechende Chinongeruch auf. In gleicher Weise wirkte Kaliumbichromat. Die Reoxydation des Hydrochinons wurde auch quantitativ ermittelt: 0,5 g Hydrochinon (1 Mol) wurden mit 1,17 g $FeCl_3$ (2 Mol) versetzt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Die Oxydation erfolgte augenblicklich: das entstehende Xylochinon ging sofort über und kristallisierte in goldgelben Kristallen zum Teil bereits im Kühlrohr aus. Die abgesaugten und getrockneten Kristalle schmolzen bei 125°. Ausbeute 0,488 g.

c). Die erhöhte Produktion von *Acetaldehyd* wurde in folgender Weise festgestellt:

Zu einer mit 50 g Hefe versetzten Lösung von 50 g Zucker in 500 ccm Wasser wurden 1,3 g in Alkohol gelösten p-Xylochinons gegeben. Am nächsten Tage wurden nochmals 25 g Zucker in 250 ccm Wasser und 25 g Hefe hinzugetan. Nach der Ausgärung wurde das bei 37° aufbewahrt gewesene und nunmehr chinonfrei gewordene Gemisch der Wasserdampfdestillation unterworfen und anreichernd destilliert. Die Prüfung auf Acetoin verlief negativ. Die Bestimmung des Acetaldehyds wurde nach *Ripper* titrimetrisch vorgenommen. Gefunden wurden 70,2 mg Aldehyd, während der in gleicher Weise ohne Xylochinon angesetzte Kontrollversuch 20,7 mg Aldehyd lieferte.

Kontrollen.

a). 100 g Hefe wurden mit 500 ccm Wasser 1 Stunde lang gekocht. Gleichzeitig wurden 100 g Rohrzucker in 300 ccm Wasser gelöst und durch halbstündiges Erwärmen mit 10 ccm n/10 Schwefelsäure auf dem Wasserbade invertiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 10 ccm n/10 Natronlauge neutralisiert und mit der Hefensuspension vereinigt. Darauf wurden 1,5392 g Xylochinon hinzugesetzt und das Gemisch sofort mit

---

[1]) *B. Heymann* und *W. Koenigs*, Ber. 20, 2396, 1887.
[2]) *R. Nietzki*, Ann. 215, 170, 1882.

Wasserdampf destilliert. Die Hauptmenge des Chinons kristallisierte in der Vorlage aus; aus der ausgeätherten überstehenden Lösung wurde nach dem Verdampfen des Äthers ebenfalls reines Xylochinon erhalten. Zurückgewonnen: 0,7422 g. Der Rückstand der Wasserdampfdestillation wurde zentrifugiert und darauf mit Äther ausgezogen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels hinterblieb ein minimaler Rückstand, der kein Hydrochinon enthielt.

b). Einer auf dieselbe Art angesetzten Kontrollmischung wurden 2,0049 g Xylochinon zugefügt; das Gemenge wurde 48 Stunden bei 37° digeriert. Zurückgewonnen: 1,0623 g. Im Rückstand ließ sich eine geringe Menge Hydrochinon feststellen.

c). Eine alkoholische Lösung von 2,5 g p-Xylochinon wurde mit 800 ccm Wasser zusammengebracht, wobei das Xylochinon wieder ausfiel, und 2 Tage im Thermostaten bei 37° aufbewahrt. Die Aufarbeitung geschah folgendermaßen: Vom ungelösten Chinon wurde abfiltriert und die Flüssigkeit zur Entfernung gelösten Chinons mit Wasserdampf behandelt. Die restierende Lösung wurde in üblicher Weise ausgeäthert. Nach Abdunsten des Äthers hinterblieb eine spärliche Menge einer öligen Flüssigkeit; Hydrochinon war nicht zu isolieren.

Der Brauerei *Schultheiß-Patzenhofer* in Berlin sind wir für reichliche Belieferung mit Hefe zu besonderem Dank verpflichtet.

Die Formgebilde der Zellmembran und ihr Verhalten bei der Zersetzung derselben.

Von

J. König.

(Aus der landwirtschaftlichen Versuchsstation zu Münster i. Wstf.)

(Eingegangen am 22. Februar 1926.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Die Frage über die Formgebilde der Zellmembran und ihr Verhalten bei der Zersetzung derselben hat neuerdings wieder eine besondere Bedeutung erlangt, weil Meinungsverschiedenheiten darüber entstanden sind, ob die Steinkohle aus dem Hauptbestandteil der Zellmembran, nämlich der Cellulose, oder aus dem Lignin derselben entstanden ist.

I.

Um diese Frage besser beurteilen zu können, möge hier eine *Darlegung der Struktur der Zellmembran* sowie der chemischen Beschaffenheit ihrer Bestandteile vorangehen.

Schon seit langem hatte man erkannt, daß in der *Zellmembran* außer *Cellulose noch andere Bestandteile* vorhanden sind, die auch eine verschiedene Zusammensetzung haben[1]). Letztere Verschiedenheit konnte man zunächst nur durch indirekte Bestimmungsverfahren (z. B. Oxydation nach *J. König*) nachweisen. Seit 1910 besitzen wir aber Verfahren, welche eine direkte Trennung und Untersuchung der Gemengteile der Zellmembran ermöglichen, so das Verfahren von *Ost* und *Wilkening* mit 72proz. Schwefelsäure, von *Willstätter* und *Zech-*

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 28, 177, 1914; *J. König* und *E. Rump*, Chemie und Struktur der Pflanzenzellmembran. Berlin, Julius Springer, 1914. In letzterer Schrift findet sich eine Zusammenstellung der einschlägigen Literatur.

meister mit rauchender Salzsäure von 1,21 spezifischem Gewicht (und mehr), von *König* und *Rump* durch fünf- bis sechsstündiges Dämpfen bei 5 Atm. Überdruck mit 1proz. Salzsäure oder von *König* und *Becker* durch Einleiten von Salzsäuregas in die schwach angefeuchtete Zellmasse (Rohfaser).

Mit Hilfe dieser Lösungsmittel und der Eigenschaft, daß die Lignine durch Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak im Gegensatz zu Cellulose und Cutin — dem dritten Bestandteil der festen Zellmembran — leicht oxydiert werden können, läßt sich die Zellmembran, die nach tunlichster Entfernung der Proteine, des Fettes und der löslichen bzw. leicht hydrolysierbaren Kohlehydrate mittels verdünnter Säuren und Alkalien übrigbleibt, wie folgt in ihre Formgebilde (Cellulose, Lignin und Cutin) zerlegen:

1. Durch Behandeln der Pflanzenstoffe mit verdünnten Säuren und Alkalien (*W. Henneberg*) oder mit Glycerin-Schwefelsäure (*J. König*) bleiben zurück Cellulose, Lignin und Cutin.

2. Durch Oxydation des Rückstandes von Nr. 1 mit H_2O_2 und Ammoniak (nach *J. König*) verbleiben Cellulose und Cutin.

3. Durch Behandeln von Nr. 1 mit 72proz. Schwefelsäure (nach *Ost* und *Wilkening* oder den anderen Verfahren) verbleiben Lignin und Cutin.

4. Durch Oxydation des Rückstandes Nr. 3 mit H_2O_2 und Ammoniak (nach *J. König*) verbleibt Cutin.

Die mikroskopische Struktur dieser vier verschiedenen Rückstände möge hier von Tannenholz und Weizenstroh wiedergegeben werden (vgl. Abb. 1 bis 8). Es zeigen alle vier Bilder

a) bei *Tannenholz* deutlich die kennzeichnenden Teile des Coniferenholzes: Tracheiden mit Hoftüpfeln, Markstrahlen (kleingetüpfelt); b) bei *Weizenstroh* deutlich die mehr oder weniger gewellten Wände der Epidermiszellen, dazwischen Kurzzellen und Spaltöffnungen; ferner zum Teil Ring- und Spiralgefäße; bei Abb. 5 auch parenchymatisches Markgewebe.

In der gleichen Weise haben wir die Zellmembrane[1]) von Weizenkleie, Gras, Apfelschale, Kartoffelschale und Neuseeländer Flachs

[1]) Man nimmt wohl fünf verschiedene Zellmembranarten an, nämlich *Lignocellulose*, worin die Cellulose mit Lignonen oder Ligninsäuren, *Pektocellulose*, worin sie mit Pektinen, *Mucocellulose*, worin sie mit Schleimstoffen, *Adipocellulose*, worin sie mit Phellonsäure (Kork), *Cutocellulose*, worin sie mit Stearocutinsäure verbunden sein soll. Wir aber haben gefunden, daß Vertreter aller dieser Gruppen nach Behandeln mit verdünnten Säuren und Alkalien Rückstände (*Rohfasern*) hinterlassen, in denen die obigen drei Formgebilde vorhanden sind.

Zellmembran
von Tannenholz.

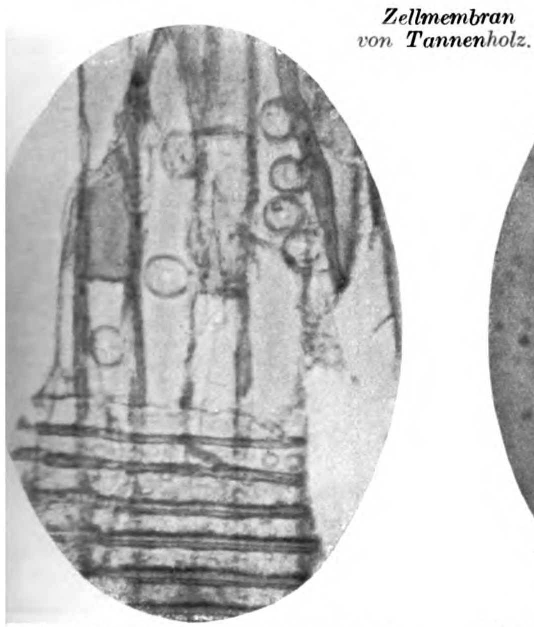


Abb. 1. Zellmembran durch Benzolalkohol und Wasser von Harz und wasserlöslichen Stoffen befreit. Vergr. 270.

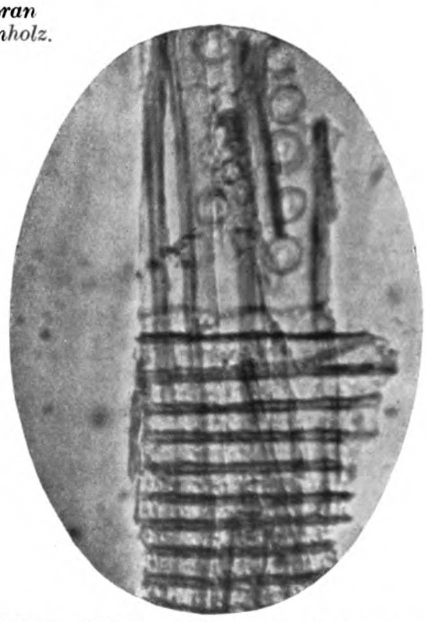


Abb. 2. Rohfaser. (Glycerinschwefelsäureverfahren von *J. König.*) Besteht aus: Cellulose + Lignin + Cutin. Vergr. 270.

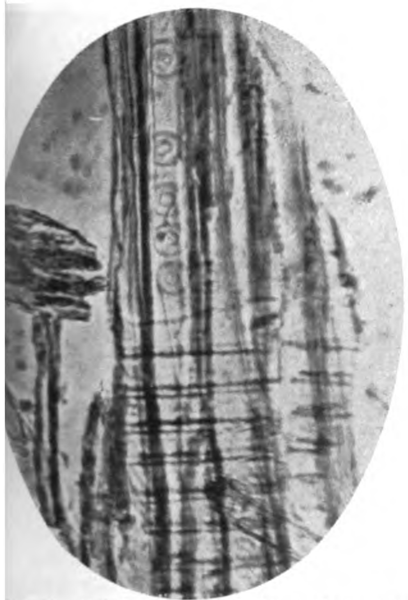


Abb. 3. Cellulose + Cutin. Nach Entfernung des Lignins durch Oxydation der Rohfaser mit Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak. Vergr. 270.

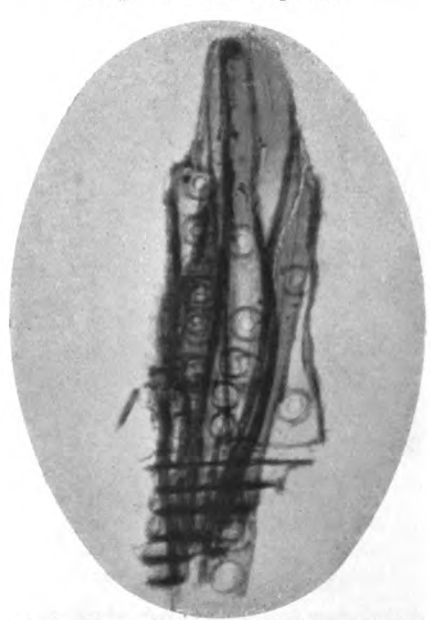


Abb. 4. Lignin + Cutin. Nach Entfernung der Cellulose durch Behandlung der Rohfaser mit 72proz. Schwefelsäure. Vergr. 270.

Zellmembran von Weizenstroh.

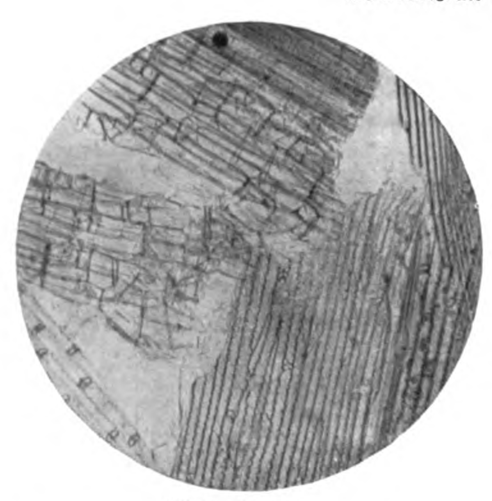


Abb. 5. Rohfaser.
(Glycerinschwefelsäureverfahren von *J. König.*)
Besteht aus: Cellulose + Lignin + Cutin.
Vergr. 70.

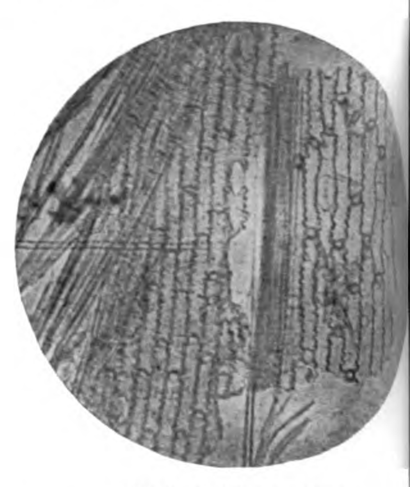


Abb. 6. Cellulose + Cutin.
Nach Entfernung des Lignins durch Oxydation der Rohfaser mit Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak. Vergr. 80.

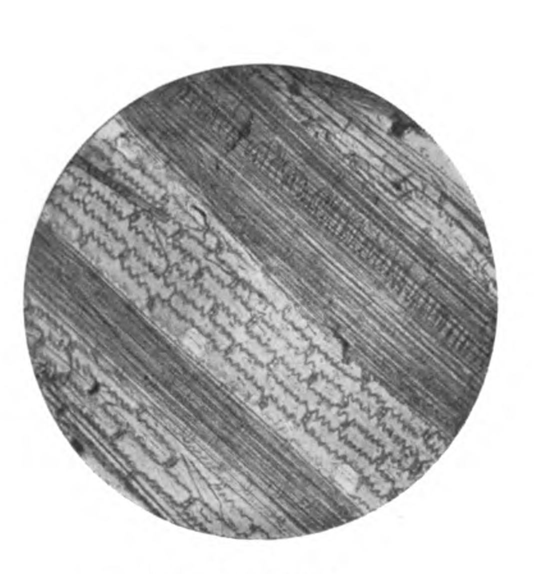


Abb. 7. Lignin + Cutin.
Nach Entfernung der Cellulose durch Behandlung der Rohfaser mit 72 proz. Schwefelsäure.
Vergr. 70.



Abb. 8. Cutin.
Nach Entfernung der Cellulose und des Lignins durch aufeinanderfolgende Behandlung der Rohfaser mit 72 proz. Schwefelsäure und Wasserstoffsuperoxyd + Ammoniak. Vergr. 80.

zerlegt und konnten überall feststellen, daß Lignin und Cutin nach Abtrennung von der Cellulose dieselbe Struktur hatten, wie die letztere bzw. die Gesamtmembran. Daraus haben wir damals geschlossen, daß Lignin und Cutin *nicht*, wie vielfach behauptet worden ist, in *chemischer Verbindung* mit der Cellulose, sondern mit ihr nur *mechanisch ver-* bzw. *durchwachsen*[1]) vorhanden sind, in ähnlicher Weise wie Leim und Kalkphosphat in den Knochen oder wie Cellulose und Kieselsäure in den Gramineen sich befinden[2]). Denn wenn es sich um eine chemische Bindung handeln würde, so müßte durch Aufhebung dieser Verbindung mittels chemischer Lösungs- oder Zerstörungsmittel auch die Struktur verändert werden; andererseits ist das Cutin eine chemische Verbindung (Wachs) für sich, die keine weitere Bindung eingehen kann, weil sie gesättigt und sehr indifferent ist.

II.

Alle Bestandteile, Cellulose, Pentosane, Lignin und Cutin, haben eine verschiedene *Elementarzusammensetzung* und *Konstitution*, nämlich:

Elemente	Cellulose Hexosane Proz.	Pentosane Proz.	Lignine + Cutine*) Proz.	Cutine**) Proz.
Kohlenstoff . . .	44,43	45,43	67,31 —71,35	68,12—69,97
Wasserstoff . . .	6,22	6,11	(4,10)— 7,80	9,65—12,40

*) Nach 8 Proben aus verschiedenen Pflanzen bzw. Pflanzenteilen.
**) Nach 6 Proben aus verschiedenen Pflanzen.

In früheren Jahren haben Verfasser und sonstige Fachgenossen die Elementarzusammensetzung des Lignins, weil es von der Cellulose noch nicht quantitativ getrennt werden konnte, indirekt berechnet und dafür im Durchschnitt 55 Proz. Kohlenstoff angenommen (vgl. *J. König* und *E. Rump*, Chemie und Struktur der Zellmembran, 1914). Dieser Wert war aber recht unsicher und wurde auch schon vor 50 Jahren mitunter viel höher gefunden, z. B. von *Stackmann*, aus dessen Untersuchungen (1878) über Coniferenholz sich für die ligninartigen Körper 65,6 bis 67,8 Proz. C berechnen. Aber noch viel früher (1859) gibt *Fremy* für den aus der Cuticula der Apfelbaumblätter gewonnenen wachsartigen Körper, den er *Cutin* nennt, 73,6 Proz. C und 11,4 Proz. H,

[1]) Man hat das Lignin auch wohl zu den *Inkrusten* gerechnet. Zu den *Inkrusten* von *unverholzten* Membranen können aber nur die Einlagerungen von Bitter-, Farb-, Gerb- und Pektinstoffen, bei den *verholzten* Membranen die Einlagerungen der aromatischen Stoffe Hadromal, Coniferin, Vanillin gerechnet werden. Diese Inkrusten sind sämtlich in verdünnten Säuren und Alkalien löslich.

[2]) *R. Sachse* hat schon 1877 diese Durchwachsung der drei Zellmembranbestandteile mit einer *Metallegierung* verglichen.

und für eine aus Agaveblättern gewonnene *Cytose* 68,3 Proz. C und 8,9 Proz. H an, also Zahlen, die mit den hier gewonnenen übereinstimmen.

Für das *Lignin* allein konnte die Elementarzusammensetzung nicht bestimmt werden, weil es bis jetzt nur zusammen mit dem Cutin gewonnen und von letzterem nur durch Zerstörung (Oxydation mit z. B. Wasserstoffsuperoxyd + Ammoniak) getrennt werden kann. Aber die Menge des Cutins ist gegenüber dem Lignin in den Pflanzen durchweg nur gering[1]), und weil der Kohlenstoffgehalt in den cutinarmen und cutinreicheren Zellmembranen nicht wesentlich voneinander abweicht, das Cutin auch für sich allein einen nahezu gleichen Kohlenstoffgehalt wie das Gemisch von Lignin + Cutin besitzt, so kann man für das Lignin einen gleich hohen Kohlenstoffgehalt annehmen.

Im allgemeinen ist man der Ansicht[2]), daß das Lignin dadurch entsteht, daß die Kohlehydrate der Zellmembran (Hexosane und Pentosane) während des Wachstums der Pflanzen durch *Ringschluß* in aromatische oder hydroaromatische Verbindungen übergehen[3]), indem gleichzeitig Alkylgruppen, Methyl bzw. Methoxyl, eingelagert werden. *P. Klason*[4])

---

[1]) So wurden von uns in der wasser- und sandfreien Substanz gefunden:

	Kleien	Stroh	Gras	Klee	Holz	Flachs	Hanf	Schalen: Apfel	Schalen: Kartoffeln	Baumrinde
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Cutin	0,90–2,03	1,00	0,75	0,60	0,14– 0,16	0,83	0,19	3,51	7,79	1,53– 2,32
Lignin	3,33–5,41	12,95	6,57	4,94	12,09–21,15	10,64	4,55	5,16	18,95	23,43–36,25

[2]) Vgl. unter anderen *W. Schrauth*, Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, 149. 1923.

[3]) *Meissner* und *Shepard* haben schon 1866 in einer Schrift (Untersuchungen über das Entstehen der *Hippursäure* im tierischen Organismus, Hannover 1866) in den Ligninen Stoffe mit Ringschluß vermutet, indem sie auf Grund von Fütterungsversuchen bei Kaninchen behaupteten, daß nicht in der Cellulose, sondern in den die Cellulose begleitenden kohlenstoffreicheren Stoffen die Muttersubstanz der Hippursäure zu suchen sei; denn wie wir jetzt wissen, setzt die Bildung von Hippursäure im Tierkörper das Vorhandensein von Stoffen mit einem Benzolkern voraus. *Meissner* und *Shepard* schrieben der Nichtcellulose die Bruttoformel $C_{14}H_{12}O_{10}$ zu oder hielten sie der Hauptmasse nach für Cuticularsubstanz im Sinne *Mohls*. Ich habe damals in Gemeinschaft mit *Th. Dietrich* (Landw. Versuchsst. **13**, 222, 1870) der Ableitung der Formel und der Begründung obiger Annahme widersprochen, indem wir auf Grund von Fütterungsversuchen behaupteten, daß von dem kohlenstoffreicheren Teil der Cellulose wenig oder gar nichts verdaut werde. Ich muß aber jetzt nach den mit vollkommeneren Untersuchungsverfahren gewonnenen Ergebnissen zugeben, daß die Annahme von *Meissner* und *Shepard*, daß das Lignin die Muttersubstanz für die im Tierkörper entstehende Hippursäure sei, wohl richtig sein kann.

[4]) Berichte der deutsch. chem. Ges. **53**, 1869, 1920; **58**, 375 u. 1761, 1925.

hält das Lignin z. B. für ein Derivat von Coniferylalkohol (Coniferylparaldehyd) von etwa folgender Konfiguration:

```
      CH3   O                CH
       |  C  |                |                  O
                                                //
 H3C          C ----------- C      C—CH:CH.C
                                                \
                                                 H
 H3C          CO.CH3  C          CH

          C
      CH2   CO              O     CO.CH3
                                \\
                                  CO.CH3
```

P. Klason unterscheidet im Fichtenlignin zwei Lignine, ein α-Lignin, $C_{22}H_{22}O_7$ bzw. $C_{20}H_{20}O_6$ nach vorstehendem Schema mit einer Acroleingruppe, und ein β-Lignin von der Bruttoformel $C_{19}H_{18}O_9$ mit nur einer Methoxylgruppe.

E. Beckmann, *Liesche* und *Lehmann*[1]) nehmen dagegen für das Lignin des Winterroggenstrohes eine Bruttoformel $C_{40}H_{44}O_{15}$ an, mit vier Methoxylgruppen und vier benzoylierbaren Hydroxylgruppen, also von folgender Differenzierung $C_{36}H_{28}O_7{<}{(O.CH_3)_4 \atop (OH)_4}$. Erstere Formel verlangt 66,3 Proz. Kohlenstoff und 23,4 Proz. Methoxyl (O . CH_3), letztere 62,8 Proz. Kohlenstoff und 16,2 Proz. Methoxyl. Erstere Kohlenstoffprozente würden sich den von uns für Gesamtlignin gefundenen Kohlenstoffgehalten von 68 bis 70 Proz. nähern, während im Gehalt an Methoxyl, wovon wir im Tanninlignin 15,99 Proz., *Fr. Fischer* in anderen Ligninen 13,3 Proz. bei 64,98 Proz. Kohlenstoff und in einem anderen rund 15 Proz. fanden, die von *Beckmann* und Mitarbeitern angenommene Formel mehr den letzteren Befunden entspricht. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß *Klason* bei seinen Untersuchungen von der Sulfitablauge, d. h. von gelöstem Holzlignin ausging, *Beckmann* und *Liesche* dagegen nur das in alkoholischem Alkali gelöste Lignin des Strohes verwendeten. Die Menge dieses letzteren betrug rund 7 Proz. vom Stroh, während der unaufgeschlossene Rückstand nach *Willstätters* Verfahren noch 15 Proz. Lignin lieferte. Im ersteren Falle kann beim Aufschließen des Holzes mit Calciumbisulfit eine Zersetzung des Lignins stattgefunden haben, im letzteren ist dagegen der größte Teil des Lignins unbeachtet geblieben, und es ist nach verschiedenen hiesigen Untersuchungen anzunehmen, daß sich das Lignin ebenso wie die Cellulose in den Pflanzen, wie wir gleich sehen werden, in verschiedenen Löslichkeitsstufen befindet und die oben von uns gefundenen Kohlenstoffgehalte sich auf die Gesamtmenge des schwerst löslichen Lignins beziehen.

Als *Hauptunterschied* zwischen den Zellbestandteilen in *chemischer* Beziehung ist zu beachten, daß das *Lignin*[2]) Methyl- bzw. Methoxylgruppen eingelagert enthält und in ammoniakalischer Lösung durch Wasserstoffsuperoxyd oxydiert werden kann, wovon das Cutin gar

---

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem. 34, 285, 1921; vgl. auch weiter diese Zeitschr. 139, 491, 1923.

[2]) In einzelnen Pflanzen kommen auch Methylpentosane in geringen Mengen vor.

nicht, die Hexosane und Pentosane dagegen nur wenig angegriffen werden.

Das *Cutin* der Zellmembran hat dagegen eine von den anderen Zellmembranbestandteilen ganz abweichende Konstitution. Es läßt sich verseifen und ist eine *Wachsart*.

So lieferte Cutin aus Roggenkleie (6,0 g) durch dreistündiges Kochen mit 150 ccm wässeriger 20proz. Kalilauge einen alkoholischen und einen sauren Anteil von folgender Beschaffenheit[1]):

	Ursprüngliches Cutin	Alkohol daraus	Säure daraus
Kohlenstoff . .	69,37 Proz.	80,34 Proz.	69,09 Proz.
Wasserstoff . .	11,77 „	13,36 „	10,97 „
Schmelzpunkt .	—	55—56°	etwa 30°

Von bekannten Alkoholen und Säuren der aliphatischen Reihen verlangen:

	Cetylalkohol $C_{16}H_{34}O$	Oktadekylalkohol $C_{18}H_{38}O$	Nonylsäure $C_9H_{18}O_2$	Caprinsäure $C_{10}H_{20}O_2$
Kohlenstoff . .	79,26 Proz.	79,91 Proz.	68,27 Proz.	69,69 Proz.
Wasserstoff . .	14,14 „	14,16 „	11,46 „	11,70 „
Schmelzpunkt .	49,—49,5°	59° „	12,5₀ „	31,4° „

Hiernach würde man das Cutin als ein Gemisch von Nonylsäurecetylester und Caprinsäureoktadekylester auffasssen können. Auch *Fremy* gibt schon (1859) an, daß sich das Cutin der Apfelbaumblätter verseifen läßt und eine flüssige Fettsäure liefert. Die Entstehungsweise des Cutins ist bis jetzt noch unbekannt.

III.

Die in der Struktur gleichen, aber in der chemischen Zusammensetzung verschiedenen Zellmembranbestandteile verhalten sich auch in der *Löslichkeit* verschieden. Wenn man Pflanzenstoffe mit Wasser, Diastase-, Pepsinlösung unter Zusatz von verdünnter Salzsäure, weiter mit Alkohol und Äther behandelt, so erhält man einen tunlichst fettfreien und proteinarmen Rückstand, der als das Gerüst der vorwiegend aus Cellulose bestehenden Zellmembran angesehen werden kann.

Behandelt man[2]) diesen Rückstand wie bei der Rohfaserbestimmung mit 1¼proz. Schwefelsäure und darauf mit 1¼proz. Kalilauge, so gehen Stoffe in Lösung, die einen *höheren* Kohlenstoffgehalt als Cellulose (Hexosane und Pentosane) besitzen; z. B. wurden von der Zellmembran von sieben verschiedenen Futtermitteln gelöst:

Durch verdünnte Schwefelsäure organische Stoffe mit . . . . 47,03 bis 50,26 Proz. C
Durch verdünnte Kalilauge . . . . 50,83 „ 57,63 „ C

[1]) Vgl. *J. König* und *W. Sutthoff*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 17, 62, 1909.

[2]) Vgl. *C. Krauch* und *v. d. Becke*, Landw. Versuchsst. 27, 337, 1882.

Durch eine Reihe weiterer Untersuchungen (vgl. Anm. 1, S. 261) wurde weiter nachgewiesen, daß ein Teil der Anhydride der Kohlehydrate (Pentosane und Hexosane) wie auch der Lignine der Zellmembran schon durch *Wasser* allein unter Druck (3 Atm., 1 Stunde lang)[1], noch mehr aber durch Kochen oder Dämpfen mit *verdünnten* (1,0 bis 3,0 proz.-) *Mineralsäuren* in Lösung geht. Die gelösten Pentosane ließen sich durch Destillation der eingedunsteten Lösungen mit Salzsäure von 1,06 spezifischem Gewicht an dem gebildeten Furfurol nachweisen und quantitativ bestimmen. Die Lösung der Lignine ergab sich daraus, daß die gelösten stickstoff- und fettfreien Stoffe nicht nur einen höheren Kohlenstoffgehalt besitzen als Hexosane (44,4 Proz.) und Pentosane (45,4 Proz.) verlangen, sondern auch daraus, daß die gedämpften Rückstände weniger Methoxyl aufwiesen als die ursprünglichen nicht gedämpften Zellmembrane.

Von den *Gesamtpentosanen* (3,62 bis 18,07 Proz. in Körnern und Stroh von Roggen und Erbsen) wurden gelöst durch Dämpfen mit Wasser:

3 Stunden bei 3 Atm.	1,62 bis 6,68 Proz.
4 „ „ 4 „	2,62 „ 11,54 „
6 „ „ 6 „	2,94 „ 15,71 „

Die (von Grasheu, Kleeheu, Bellmehl und Biertreber) durch einstündiges Dämpfen bei 3 Atm. *gelösten* stickstoff- und fettfreien organischen Stoffe enthielten *Kohlenstoff*:

Gelöst durch *Wasser* unter Druck	Gelöst durch 2 proz. Glycerinschwefelsäure
48,40 bis 51,06 Proz.	51,73 bis 53,22 Proz.

Von den *Gesamtligninen* (1,00 bis 2,14 Proz.) dieser Futtermittel

blieben im Rückstand	0,41 bis	1,36 Proz.	blieben im Rückstand	0,19 bis	0,56 Proz.
wurden gelöst	0,59 „	0,88 „	wurden gelöst	0,81 „	1,44 „

Ich habe aus allen diesen Untersuchungen geschlossen, daß die Bestandteile der festen, stickstoff- und fettfreien *Zellmembran in verschiedenen Polymerisations- bzw. Kondensationsstufen* vorhanden sein müssen.

E. Schulze hat denjenigen Teil der Cellulose, der durch Kochen oder Dämpfen mit 2- bis 3proz. Mineralsäuren (Salzsäure) gelöst wird, als *Hemicellulosen* bezeichnet und wegen ihrer leichteren Hydrolysierbarkeit wie die Stärke zu den *Reservestoffen* gerechnet. Dementsprechend würde man den Teil der Cellulose der Zellmembran, der schon durch Wasser allein unter Druck gelöst (hydrolysiert) wird, als *Protocellulose*,

[1]) Die Pentosane werden in geringer Menge auch durch Behandeln der Zellmembran mit Diastase- und Pepsinlösung unter Zusatz von verdünnter Salzsäure hydrolysiert. So wurden von den Gesamtpentosanen (2,12 bis 18,07 Proz.) bei fünf Futtermitteln gelöst durch übliches Behandeln mit:

Diastase + Salzsäure	0,94 bis 2,74 Proz.
Pepsin + Salzsäure	0,29 „ 2,07 „

und den Teil, welcher erst durch konzentrierte Säuren (72 proz. Schwefelsäure oder 42 proz. Salzsäure) gelöst wird, als *Orthocellulose* bezeichnen können.

Außer dem Glykosan als Hauptbestandteil der Zellmembran gibt es vereinzelt auch noch andere Hexosane in derselben, z. B. *Galaktan* im Samen der Hülsenfrüchte, *Mannan* in Kaffeesamen, Datteln und anderen. Diese verhalten sich anscheinend ganz wie die Pentosane, d. h. sie sind wie die Pentosane fast nur in der Proto- und Hemiform vorhanden und werden wie die Pentosane fast ganz durch verdünnte Säuren gelöst. Für das Lignin ist zu berücksichtigen, daß der Teil, welcher durch verdünnte und selbst erst durch starke Säuren gelöst wird, farblos ist, weil die Lösung der Orthocellulose durch 72 proz. Schwefelsäure wasserhell ist, während das hierin unlösliche Lignin als braune Masse zurückbleibt; es möge daher zwischen *ungefärbtem* und *gefärbtem Lignin* unterschieden werden, und man kann dann für die einzelnen Bestandteile der Zellmembran folgende Löslichkeitsübersicht aufstellen:

Nr.	Löslich durch Behandeln mit	Pentosan	Mannan	Galaktan	Glykosan (eigentliche Cellulose)	Farblose Lignine	Braungefärbte Lignine	Cutin, grau
1	Wasser allein unter Druck, *Protoform*	Alle zum geringen Teil löslich					unlöslich	unlöslich
2	2—3 proz. Salz- oder Schwefelsäure unter Druck oder durch Kochen, *Hemiform*	bis auf geringe Mengen löslich			z. T. löslich	z. T. löslich		
3	72 proz. Schwefel- oder 42 proz. Salzsäure in der Kälte, *Orthoform*	letzte Reste löslich			völlig löslich	z. T. löslich		
4	Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak	—	—	—	—	völlig oxydierbar		unangegriffen

Das zuletzt übrigbleibende Cutin ist wachsartig, in den gewöhnlichen Wachslösungsmitteln sehr schwer oder kaum löslich — am besten noch in Chloroform —, kann aber durch längeres Kochen mit Kalilauge (20 proz.) verseift werden.

IV.

Man muß indes bei den verschiedenen Löslichkeitsstufen der Pentosane, Hexosane und Lignine nicht an scharfe Abgrenzungen denken, sondern man muß *allmähliche Übergänge* annehmen, die je nach *Art und Alter der Pflanzen* verschieden sein können bzw. sind. Denn, wie die Zellmembranmasse als solche, nimmt auch die *Verhärtung* bzw. *Verholzung* derselben mit dem Alter der Pflanzen zu. So fand ich in

Gemeinschaft mit *A. Fürstenberg* und *R. Murdfield*[1]) in der Pflanzentrockensubstanz:

Wachstumsstufe	Gras				Rotklee			
	Rohfaser Gesamt-Proz.	Orthocellulose Proz.	Lignin Proz.	Cutin Proz.	Rohfaser Gesamt-Proz.	Orthocellulose Proz.	Lignin Proz.	Cutin Proz.
Vor der Blüte . .	22,75	20,32	3,86	1,07	19,55	14,01	4,49	1,05
In " " . .	29,57	22,49	6,01	1,07	22,92	16,59	5,32	1,01
Nach " " . .	33,20	24,08	8,25	0,89	29,22	20,65	7,05	1,52
Reifes Erbsenstroh ergab					37,41	23,61	11,28	2,22

Die vorstehenden Ergebnisse wurden in der Weise erhalten, daß die Rohfaser der Pflanzen, um das Lignin zu entfernen, mit Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak oxydiert, die Rückstände zur Lösung der Cellulose mit Kupferoxydammoniak behandelt wurden, so daß das Cutin als unangegriffener Teil zurückblieb. Dieses Trennungsverfahren hat sich aber nicht als genau erwiesen, denn in einigen Fällen (bei Kleien) erwies sich die gelöste Cellulose nicht als rein, sondern enthielt noch Methoxyl- bzw. Acetylgruppen eingeschlossen. Ich habe aber in Gemeinschaft mit *Fr. Hühn*[2]) und *E. Rump* die Lösung der Orthocellulose in der Zellmembran von *Gras* in verschiedener Wachstumsstufe auch noch nach *Ost* und *Wilkening* mit 72proz. Schwefelsäure vorgenommen und dabei gefunden, daß durch Behandlung der mit 2proz. Glycerinschwefelsäure erhaltenen Rückstände (Rohfaser) mit 72proz. Schwefelsäure nicht allein Orthocellulose, sondern mit ihr auch weitere Ligninanteile gelöst werden, die ich, wie schon gesagt, im Gegensatz zu dem rückständigen braunen Lignin als ungefärbte Lignine bezeichnen möchte, weil die schwefelsaure Lösung selbst nach längerer Zeit hell und klar bleibt.

Die Veränderung der Bestandteile während des Wachstums des Grases erhellt aus folgenden Zahlen für die wasser- und aschenfreie Substanz:

Wachstumsstufe	Protein	Fett	Pentosane	Stickstofffreie Extraktstoffe	Rohfaser	In der Rohfaser			
						Cellulose	farbloses, lösliches Lignin	braungefärbtes, unlösl. Lignin	Cutin
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Junges Gras	21,44	4,07	15,34	43,68	15,47	13,31	0,39	1,27	0,52
Gras vor der Blüte . . .	17,52	5,10	20,06	29,31	28,01	20,88	4,60	1,78	0,74
Gras in der Blüte . . .	17,98	4,28	20,71	23,75	33,28	25,76	3,63	3,12	0,77

Wenn die vorstehenden Zahlen auch nur als annähernd und relativ richtig angenommen werden können, so sprechen sie doch auch für die von vielen Forschern vertretene Ansicht, daß die erste gebildete Zell-

[1]) Landw. Versuchsst. 65, 55, 1907.

[2]) *Fr. Hühn*, Bestimmung der Cellulose in den Holzarten. Inaug.-Diss. Münster i. W. 1911.

haut aus reiner (Ortho-) Cellulose besteht, an oder in die mehr oder weniger schnell einerseits Anhydride anderer Kohlehydrate (Pentosane, Mannane, Galaktane), andererseits Methoxyl an- bzw. eingelagert werden, wodurch unter Ringschluß Lignine entstehen, während die Bildung des Cutins noch unbekannt bleibt und in der Menge gegen Lignin zurücktritt.

Das Cutin findet sich zwar in allen Pflanzenteilen, aber vorwiegend in den *äußeren* Membranteilen, wo ihm die biologische Aufgabe des Schutzes gegen Welken und äußere Angriffe zukommen soll. Daraus erklärt sich auch der kaum nennenswerte Cutingehalt der alten Holzarten (0,14 und 0,16 Proz.) im Vergleich zu dem der einjährigen Pflanzen mit 0,5 bis 2,0 Proz. Cutin. Aus demselben Grunde sind wohl auch die Cutinzahlen in den Schalen von Äpfeln und Kartoffeln bedeutend höher, nämlich 3,51 bis 7,79 Proz. in der wasser- und aschenfreien Substanz.

Jedenfalls nimmt mit der Cellulose in der Pflanze auch das Lignin zu, und ist es wohl denkbar, daß die jüngeren, leichter löslichen Lignine durch eine geringere Anzahl gebildeter Kohlenstoffringe und eingelagerter Methoxylgruppen von dem älteren Lignin unterschieden sind.

Tatsächlich wird nach zahlreichen Versuchen die Zellmembran (Rohfaser) von den Tieren (auch Wiederkäuern) um so höher verdaut, je weniger die Pflanzen entwickelt sind und je weniger die Zellmembran verholzt, d. h. mit Lignin durchsetzt ist. Der Mensch kann überhaupt wohl nur die zarte, jugendliche, tunlichst ligninfreie Cellulose verdauen.

V.

Daß bei der *Verarbeitung* der Zellmasse im Tiermagen die *Cellulose* in stärkerem Grade angegriffen und *verdaut* wird als die Lignine, kann schon daraus geschlossen werden, daß die nach Behandeln von Futter und Kot mit verdünnten Säuren und Alkali, sowie mit Alkohol und Äther erhaltene Kotrohfaser infolge des höheren Ligningehaltes stets mehr Kohlenstoff enthält als die Futterrohfaser. Ich habe dieses aber auch noch in Gemeinschaft mit *Fürstenberg* und *Murdfield* (l. c.) durch Versuche bei Schafen direkt nachweisen können. Darnach wurden in Prozenten der verzehrten Menge verdaut:

Entwicklungszustand der Pflanzen	Gras			Kleeheu			Erbsenstroh		
	Gesamt-Rohfaser Proz.	Cellulose Proz.	Lignin Proz.	Gesamt-Rohfaser Proz.	Cellulose Proz.	Lignin Proz.	Gesamt-Rohfaser Proz.	Cellulose Proz.	Lignin Proz.
Vor der Blüte	70,27	83,40	16,69	56,96	75,22	13,12	—	—	—
In „ „	64,31	73,08	43,29	52,16	62,97	25,89	—	—	—
Nach „ „	46,89	56,72	23,73	39,46	54,84	4,56	42,45	51,09	28,36

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Versuche bei Kaninchen und Schweinen. Wenn auch die Trennung der Membranbestandteile nach dem ersten (S. 271), nicht genauen Trennungsverfahren erfolgte, so werden doch die relativen Beziehungen in der prozentualen Ausnutzung von Reincellulose und Lignin bestehen bleiben.

Im Darm der Tiere wird die Cellulose durch spezifische Bakterien (wie den anaeroben Bacillus cellulosae dissolvens) abgebaut. Aber auch außerhalb des Tiermagens, bei der Zersetzung der Zellmasse in der Natur (in oder unter Wasser, im Boden und anderem) muß ein *biologischer* Vorgang angenommen werden.

C. Neuberg und *R. Cohn*[1]) haben nachgewiesen, daß Cellulose und ihre Spaltungserzeugnisse (Glykose und Cellobiose *Hess*) durch die Wasserstoff und Methan bildenden Bakterien, sowie durch thermophile Bakterien, z. B. in Teichschlamm und Pferdemist nach Art der Buttersäure- und Essigsäuregärung angegriffen und unter Bildung von Acetaldehyd abgebaut werden. *Fr. Fischer* und Mitarbeiter[2]) haben beobachtet, daß sich auf Cellulose und cellulosehaltigen Stoffen, die mit einer unorganischen Nährlösung und mit Bakterien aus Gartenerde (durch Aufschlämmen mit Wasser) befeuchtet waren, nach 2 bis 9 Tagen Pilze entwickelten, auf Lignin, das in derselben Weise behandelt worden war, dagegen kein Pilzwachstum auftrat.

Diesen Ergebnissen entsprechend nimmt bei der Verwesung der organischen Stoffe die Cellulose schneller ab als die Lignine, indem letztere sich in den Rückständen ansammeln und *prozentual* zunehmen. So fanden *Rose* und *Lisse*[3]) in frischem und verschiedengradig vermodertem Holz:

Bestandteile	Holz frisch Proz.	halb vermodert Proz.	stark vermodert Proz.
Cellulose	59,0	41,7	8,7
Methoxyl	3,9	5,2	8,7

Auch *Bray* und *Andrews* bestätigen den biologischen Vorgang beim Holzzerfall, und *Wehmer* zeigte die Widerstandsfähigkeit des Lignins hierbei. Nach *Fr. Fischer* und Mitarbeitern (l. c.) nimmt auch bei der Verwesung des Torfes der Methoxyl-, d. h. Ligningehalt prozentual mit dem Alter (d. h. mit der Tiefe) zu; sie fanden in der Torftrockensubstanz:

Torfschicht	Tiefe m	Aschengehalt Proz.	Methoxyl Proz.	In konz. HCl unlöslich Proz.	In NaOH löslich Proz.	Bitumengehalt Proz.
Oberste ...	0	1,2	0,49	29,5	11	2,0
Mittlere ...	2	1,7	1,22	58,0	20	4,9
Unterste ...	3	1,8	1,67	72,5	35	7,7

[1]) *C. Neuberg* und *R. Cohn*, diese Zeitschr. **139**, 527, 1923.

[2]) *Fr. Fischer*, Gesammelte Abhandlungen zur Kenntnis der Kohle **5**, 1922; vgl. auch Die Naturwiss. **9**, 958, 1921.

[3]) Journ. Ind. Engin. Chem. **9**, 284, 1917.

Für das reine Lignin fanden *Fr. Fischer* und Mitarbeiter 15 Proz., für Ligninhuminsäure 14 Proz., für Braunkohle etwa 2 Proz., für Steinkohle kein Methoxyl (OCH_3) mehr. Auch beim Torf kann mit dem Älterwerden der Ligningehalt prozentual wieder abnehmen.

Aus diesen Gründen denkt sich *Fr. Fischer* die Bildung der Steinkohle aus Lignin in folgender geologischen Zeitfolge: Lignin ⟶ natürliche Huminsäure ⟶ Torf ⟶ Braunkohle ⟶ Steinkohle. Zwischen mancher Torfsorten und Braunkohlen ist nur ein geringer Unterschied; der ältere Torf unterscheidet sich vorwiegend nur durch den kolloiden Zustand von der Braunkohle. Bei dem Übergang der älteren Braunkohle zur Steinkohle klafft bis jetzt allerdings eine Lücke; indes ist hier eine verschieden hohe Überdeckung und dadurch bedingte erhöhte Temperatur wirksam gewesen, indem, wie *Fr. Fischer* annimmt, die zerfallene Pflanzen- oder Holzmasse bei geringer Erdüberdeckung sich in Braunkohle verwandelt, daß aber bei sehr hoher Erdüberschichtung der Zustand von Braunkohle nicht bestehen bleibt.

VI.

Ohne hier weiter auf diese Frage einzugehen, mögen die Ergebnisse von Versuchen mitgeteilt werden, welche bezweckten, die *Bildung* von *Humus* im *Boden* aus *organischen* Stoffen (Stalldünger) aufzuklären.

Die Versuche wurden in Gemeinschaft mit Dr. *J. Hasenbäumer*, Dr. *R. Balks*[1]) und Dr. *M. Bach*[2]) in der Weise angestellt, daß wir sechs verschiedene Bodenarten reichlich mit Stallmist (einem Gemisch von Strohhäcksel und Kuhkot) düngten, in verschiedenen Zeitabständen Bodenproben in gutem Durchschnitt entnahmen und auf Gehalt an unorganischen und organischen Bestandteilen (Stickstoff, Gesamtkohlenstoff, sowie Kohlenstoff in Form von Pentosanen und Methoxyl) untersuchten. Die Bestimmung des Hexosan- (bzw. Cellulose-)Kohlenstoffs, sei es durch Überführen in Zucker, sei es durch Lösen in 72proz. Schwefelsäure oder durch rauchende Salzsäure (1,21) oder Kupferoxydammoniak, wollte nicht gelingen, weil die mineralischen Bestandteile sich alsbald so innig und fest mit den organischen Stoffen des Stallmistes vermengten, daß eine quantitative Bestimmung etwa gelöster bzw. hydrolysierter Cellulose nicht möglich war. Dagegen lieferte die Bestimmung der Pentosane noch *Tollens* in je 50 g, des Methoxyls nach *Zeisel* und *Fanto* in je 15 g, des Gesamtstickstoffs nach *Kjeldahl* in je 20 g Boden stets recht gut übereinstimmende Ergebnisse. Der Gesamtkohlenstoff wurde nach *J. Simon*[3]) in je 5 g Boden mit Silberbichromat und Schwefelsäure bestimmt, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß dieses Verfahren mit der Elementaranalyse gute Übereinstimmung lieferte.

Zur Ermittlung der in 1proz. Kaliumsulfatlösung *löslichen Stickstoffverbindungen* wurden je 100 g Boden und 10 g Kaliumsulfat mit destilliertem Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt und eine Stunde lang im Schüttelapparat geschüttelt. Dann wurde filtriert und 800 ccm der erhaltenen Lösung — entsprechend 80 g Boden — wurden auf ein kleines Volumen eingedampft und die Stickstoffbestimmungen nach *Kjeldahl* ausgeführt.

---

[1]) Landw. Versuchsst. 103, 221, 1925.
[2]) Ebendaselbst 1926.
[3]) C. r. 177, 404, 1923.

Auf diese Weise wurden für 1 kg wasserfreien Bodens in den verschiedenen Zeitabständen im Mittel der sechs Böden folgende Ergebnisse erhalten:

Nr.	Zeit der Probenahme	Stickstoff		Kohlenstoff in Form von		
		Gesamt- mg	leicht löslich mg	Gesamt- mg	Pentosan mg	Methoxyl mg
1	Vor der Düngung 13. IX. 1923	1670	44	17 090	1630	450
2	Nach der Düngung 21. I. 1924	1870	50	21 060	2990	900
3	7. IV. 1924	1730	49	20 380	2600	747
4	2. VI. 1924	1740	91	19 740	1850	613
5	3. XI. 1924	1670	52	17 990	1540	617
6	23. VII. 1925	1640	50	17 896	1460	570

Nr.	Zeit der Probenahme	Von den am 21. I. 1924 vorhandenen Mengen waren in Prozenten der zugeführten Menge noch vorhanden			Auf 1000 g Kohlenstoff kommen Kohlenstoff in Form von	
		Gesamt-Kohlenstoff Proz.	Pentosan Proz.	Methoxyl Proz.	Pentosan g	Methoxyl g
1	Vor der Düngung . .	—	—	—	40,2	11,9
2	Nach der Düngung 21. I. 1924	—	—	—	70,1	18,8
3	7. IV. 1924	82,9	71,5	66,0	55,8	15,8
4	2. VI. 1924	64,8	15,0	36,2	41,9	13,4
5	3. XI. 1924	21,7	— 10,1	37,1	37,0	15,0
6	23. VII. 1925	18,9	— 16,4	26,6	36,2	13,8

Die im Stall-(Stroh-)Dünger zugeführten *Pentosane* haben hiernach schon *vor* Ablauf eines Jahres so weit abgenommen, daß von da an ausschließlich die ursprünglich im Boden vorhandenen Pentosane angegriffen wurden. Von dem *Gesamtkohlenstoff*, der vorwiegend aus Cellulosekohlenstoff besteht, sind nach $1\frac{1}{2}$ Jahren nur mehr 18,9 Proz., von dem *Methoxyl* bzw. den *Ligninen* noch 26,6 Proz. vorhanden. Das Methoxyl bzw. Lignin nimmt nur im Anfang der Einverleibung mit dem Boden stark ab, hält sich dann aber auf nahezu gleicher Höhe, so daß seine Menge nach $1\frac{1}{2}$ Jahren im Boden noch höher ist als vor der Einbringung des Stalldüngers[1]). Hieraus muß man schließen, daß

[1]) Auffallend ist auch die starke Abnahme des *Stickstoffs* (bzw. der rasche Abbau der Proteine), so daß schon nach einem Jahre der Stickstoff des Bodens auf seinen Gehalt vor der Düngung herabgesunken ist. Das ist schon öfter nach Zuführung von Strohdünger zum Boden festgestellt und wird auf Denitrifikationsvorgänge zurückgeführt, die mit der Zersetzung der Strohbestandteile verbunden sind.

auch der *Humus* des *Bodens* vorwiegend aus den *Ligninen* der organischen Düngstoffe gebildet wird, und daß es begründet ist, wenn man für den Kohlenstoffgehalt des Bodenhumus durchschnittlich 58 Proz. C annimmt, während die organischen Stoffe, die durch Düngung dem Boden zugeführt werden, nur 47 bis 51 Proz. C zu enthalten pflegen. *Sven Odén*[1]) gibt für die aus dem Bodenhumus isolierte Humussäure 58 Proz. C, für die Hymatomelansäure 62 Proz. C, für die Fulvosäure 55 Proz. C an.

Wenn also die Zersetzung der *organischen* Stoffe selbst bei sehr starker *Durchmengung* mit den *mineralischen* Bestandteilen des Bodens in der Weise vor sich geht, daß die Anhydride der Kohlehydrate, sowie die Proteine rascher und stärker zersetzt werden als die Lignine, so ist dieses bei Anhäufung von organischen Stoffen für sich allein erst recht anzunehmen und erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die Steinkohle letzten Endes, wenn auch nicht ausschließlich, so doch wesentlich mit aus Ligninen gebildet worden ist. Wenn die Steinkohlen trotz des großen Massenschwunds noch vielfach die Formen der ursprünglichen Pflanzenteile erkennen lassen, so spricht das nicht gegen diese Annahme, weil das Lignin als Gebilde der Zellmembran nach Entfernung der Cellulose die Struktur der Zellmembran besitzt und beibehält. Auch für die Bildung des *Bitumens* aus *Wachsen*, die sich während der Entwicklung der Kohle langsam zu öligen Kohlenwasserstoffen verändern, kann recht wohl das Cutin der Pflanzen mit herangezogen werden, welches, ebenfalls von der Struktur der Zellmembran, die Cellulose und die Lignine begleitet, eine wachsartige Verbindung ist und noch schwerer als die Lignine oxydiert bzw. hydrolysiert wird.

[1]) Kolloidchem. Beihefte 11, 75, 1919.

Über die Löslichkeit des Glykokolls in wässeriger und in alkoholisch-wässeriger Lösung bei variierter Wasserstoffzahl.

Von

Kingo Sano.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Aichi-Medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 4. Januar 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer vorangegangenen Mitteilung[1]) wurde die Löslichkeit einiger schwer löslicher Aminosäuren bei variiertem p_H untersucht. In der jetzigen Mitteilung soll dasselbe für eine in Wasser lösliche Aminosäure, das Glykokoll, untersucht werden, und es soll gleichzeitig festgestellt werden, inwieweit die Theorie der Löslichkeit der Ampholyte sich auch in alkoholisch-wässerigen Lösungen bewährt. Die Schwierigkeit bei der Untersuchung wässeriger Lösungen einer leicht löslichen Aminosäure besteht darin, daß man sehr große Mengen Säure oder Lauge zusetzen muß, um in einer stets an Glykokoll gesättigten Lösung das p_H in genügend weiten Grenzen zu variieren. Dabei wird die gesamte Ionenkonzentration der Lösung gleichzeitig in weiten Grenzen variiert, man kann es nicht vermeiden, Lösungen mit einer Salzkonzentration von mehr als 1 molar zu benutzen und die hier festgestellte Löslichkeit mit der für fast elektrolytfreie Lösungen derselben Versuchsreihe gefundenen Löslichkeit zu vergleichen. Da der Aktivitätsfaktor sowohl des undissoziierten Glykokolls wie auch seiner Ionen mit der Gesamtelektrolytkonzentration variieren muß, so ist es von vornherein fraglich, ob das einfache, auf *Konzentrationen* bezogene Massenwirkungsgesetz noch mit genügender Genauigkeit brauchbar ist. Aus den Untersuchungen von *Brönstedt* und *La Mer*[2]) über den Einfluß fremder Elektrolyte auf die Löslichkeit schwer löslicher Elektrolyte geht hervor, daß der Einfluß der Zusatzelektrolyte auf die Aktivität der schwer

---

[1]) *K. Sano*, Diese Zeitschr. **168**, 14, 1926.

[2]) *Brönstedt*, Journ. Amer. Chem. Soc. **42**, 761, 1920; **44**, 938, 1922, *Brönstedt* und *La Mer*, ebendaselbst **46**, 555, 1924.

löslichen Elektrolyte unter Umständen sehr groß werden kann. In solchen Fällen ist das auf Konzentrationen bezogene Massenwirkungsgesetz nicht anwendbar. Aber auch die Löslichkeit von unelektrischen Molekülarten wird durch Elektrolyte unter Umständen stark beeinflußt, eine Tatsache, welche schon lange bekannt ist und unter dem Gesichtspunkt der Aktivitätstheorie neuerdings von *Linderström-Lang*[1]) untersucht worden ist. In unserem Falle, wo in der Lösung sich gleichzeitig undissoziiertes Glykokoll und seine Ionen befinden, wird man annehmen müssen, daß der Einfluß fremder Salze auf die Aktivität dieser beiden Ionenarten im allgemeinen verschieden sein wird, wodurch die theoretische Behandlung noch mehr erschwert wird. Allein der Umstand, daß gerade für Glykokoll der Einfluß der Elektrolyte auf die Aktivität im allgemeinen klein zu sein scheint, ermöglichte die Durchführung dieser Versuche und eine theoretische Behandlung nach dem einfachen Massenwirkungsgesetz. Die Änderung der Löslichkeit durch Elektrolyte ist nämlich bei verschiedenen Stoffen sehr verschieden. So wird z. B. nach *Linderström-Lang* durch Zusatz von 1 Mol. NaCl pro Liter die Löslichkeit des Chinons etwa um 13 Proz., die des Hydrochinons um 43 Proz., die der Borsäure nur um 3 Proz. herabgedrückt. Das Glykokoll gehört zu denjenigen Stoffen, deren Löslichkeit durch fremde Ionen offenbar nicht stark beeinflußt wird. Für unsere Versuche kommen nur Na- und Cl-Ionen in Betracht, und der Einfluß dieser Ionen selbst in hoher Konzentration auf die Löslichkeit des Glykokolls erweist sich als sehr gering. Das zeigt sich daran, daß in solchen Versuchen, wo es möglich war, ein bestimmtes p_H in einer relativ ionenarmen Lösung herzustellen, die Löslichkeit bei diesem p_H durch Zusatz von viel NaCl nur sehr wenig verändert wird. Im isoelektrischen Punkte wurde die Löslichkeit durch Zusatz von 0,5 Mol. NaCl pro Liter nur um 3 Proz. verändert, und zwar erhöht, durch 2 Mol. NaCl um 7 Proz. Aber auch die Löslichkeit des Glykokolls in 0,5 n NaOH ($p_H = 8{,}78$) wurde durch Zusatz von 2 Mol. NaCl pro Liter die Löslichkeit nur um 6,5 Proz. erhöht. Unter diesen Umständen scheint es, daß die durch NaCl hervorgerufenen Änderungen der Aktivität im Bereich der sonstigen experimentellen Fehler liegen. Diese bestehen bei höheren Salzkonzentrationen hauptsächlich in der p_H-Messung, weil in solchen Fällen eine völlige Ausschaltung des Diffusionspotentials der Gaskette kaum möglich ist. Ein Fehler von einem Millivolt würde bewirken, daß die nach dem Massenwirkungsgesetz berechnete Löslichkeit schon um 5 Proz. von der für das gemessene p_H berechneten Löslichkeit abweicht. In Anbetracht dieses Umstands können wir den Einfluß der Salze unter unseren Bedingungen vernachlässigen. Gleichzeitig sollte geprüft

[1]) *Linderström-Lang*, C. r. Lab. Carlsberg, Kopenhagen, 15, Nr. 4, 1924.

werden, ob auch in wässerig-alkoholischen Lösungen die Abhängigkeit der Löslichkeit von p_H im Sinne der einfachen Massenwirkungsgesetze bestehen bleibt.

Die absolute Löslichkeit des Glykokolls im isoelektrischen Punkte wird durch Alkoholzusatz stark herabgesetzt, durch 80 Proz. Alkohol auf den 100. Teil der Löslichkeit im Wasser. Trotzdem werden wir sehen, daß *die relative Löslichkeit* bei beliebigem p_H, verglichen mit der im isoelektrischen Punkte bei gleichem Alkoholgehalt, der auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Theorie der Löslichkeit folgt. Nach der Theorie ist die Löslichkeit $\varLambda$ bei einem beliebigen p_H, verglichen mit der minimalen Löslichkeit λ im isoelektrischen Punkte, auf der alkalischen Seite gegeben durch die Gleichung

$$\frac{\varLambda}{\lambda} = 1 + \frac{k_a}{[H^\cdot]}$$

und auf der sauren Seite vom isoelektrischen Punkte

$$\frac{\varLambda}{\lambda} = 1 + \frac{k_b}{[OH']} = 1 + \frac{k_b}{k_w}[H^\cdot],$$

wo k_a und k_b die Säure- und Basendissoziationskonstanten bedeuten und k_w das Ionenprodukt des Wassers in dem jeweiligen Lösungsmittel ist. Wir können $\frac{k_b}{k_w}$ als eine Konstante $\frac{1}{k_1}$ zusammenfassen, deren Kenntnis für jedes Lösungsmittel ausreichend ist und die Bestimmung der Einzelwerte von k_b und k_w überflüssig macht. Dann ist auf der sauren Seite

$$\frac{\varLambda}{\lambda} = 1 + \frac{[H^\cdot]}{k_1}.$$

Indem wir es unentschieden lassen, welche der beiden Konstanten k_a und k_b die Dissoziation der Carboxylgruppe, und welche die der Aminogruppe beherrscht, können wir beide Konstanten auf $H^\cdot$ beziehen[1]) und bezeichnen die früher sogenannte Säurekonstante k_a mit k_2, also

$$k_a = k_2$$

und die früher sogenannte Basenkonstante

$$k_b = \frac{k_w}{k_1}.$$

Dann ist die $[H^\cdot]$ des isoelektrischen Punktes J,

$$J = \sqrt{\frac{k_a}{k_b} k_w} = \sqrt{k_1 \cdot k_2}$$

[1]) *N. Bjerrum*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **104**, 147, 1923; *L. Michaelis* und *Mizutani*, ebendaselbst **116**, 136, 1925.

und die relative Löslichkeit auf der einen Seite vom isoelektrischen Punkt ist

$$\frac{\Lambda}{\lambda} = 1 + \frac{[H^{\cdot}]}{k_1}$$

und der anderen Seite

$$\frac{\Lambda}{\lambda} = 1 + \frac{k_2}{[H^{\cdot}]}.$$

Die Werte von k_1 und k_2 müssen für jedes Lösungsmittel je nach dem Alkoholgehalt besonders bestimmt werden. Um k_1 zu bestimmen, wird ein Gemisch von 0,01 n Glykokoll und 0,01 n Glykokollchlorhydrat der Reihe nach in reinem Wasser und in den verschiedenen Gemischen von Alkohol und Wasser hergestellt und elektrometrisch p_H gemessen. Dieses p_H ist $= pk_1$ für das betreffende Lösungsmittel. Streng genommen, ist es das „auf den Salzgehalt der betreffenden Zusammensetzungen reduzierte[1])" pk_1', aber in Anbetracht der erörterten Verhältnisse wird kein Unterschied zwischen dem auf unendliche Verdünnung bezogenen wahren pk_1 und dem auf etwas salzhaltige Lösung „reduzierten" pk_1' gemacht. Die p_H-Messungen wurden mit der Gaskette bei derselben Temperatur ausgeführt wie bei den Löslichkeitsbestimmungen, bei 35°, und stellten somit eine Ergänzung zu den Messungen von *Michaelis* und *Mizutani*[2]) bei 19,5° dar. Als Ableitungselektrode wurde eine gesättigte Kalomelelektrode benutzt, deren Potential täglich an einer Gaselektrode mit Standardacetat bei 35° geeicht wurde. Das p_H des Standardacetats wurde = 4,62 gesetzt. Zur Vernichtung des Diffusionspotentials wurde das Verfahren von *Michaelis* und *Fujita*[3]) angewendet. pk_2 wurde in ganz analoger Weise mit einem Gemisch von 0,01 n Glykokoll und 0,01 n Glykokoll-Na bestimmt. Die Messungen ergeben folgende Resultate:

Elektrometrische Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Glykokolls in alkoholisch-wässerigen Lösungen.

Tabelle I. 1. Glykokoll in saurer Lösung. Temperatur 35,0°. Die Lösungen enthalten je 0,01 Mol. Glykokoll und Glykokoll-Chlorhydrat pro Liter.

Alkoholgehalt in Volumprozenten	Potentialdifferenz gegen gesättigte Kalomelelektrode	Dieselbe nach Korrektur wegen des Dampfdrucks	pk_1 für 35,0° (= dem p_H dieser Lösung)	pk_1 für 19,5° nach *Michaelis* und *Mizutani*
0	382,5	383,1	2,44	2,54
20	399,0	400,5	2,68	2,70
40	410,0	411,9	2,88	2,96
60	423,0	424,8	3,09	3,28
80	439,0	440,9	3,35	3,70

[1]) *N. Bjerrum*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **104**, 147, 1923; *L. Michaelis* und *Mizutani*, ebendaselbst **116**, 136, 1925.

[2]) l. c.

[3]) *Michaelis* und *Fujita*, diese Zeitschr. **142**, 398, 1923.

2. Glykokoll in alkalischer Lösung. Temperatur 35,0°. Die Lösungen enthalten je 0,01 Mol. Glykokoll und Glykokoll-Natrium pro Liter.

Alkoholgehalt im Volumprozenten	Potentialdifferenz gegen gesättigte Kalomelelektrode	Dieselbe nach Korrektur wegen des Dampfdrucks	pk_2 für 35,0° ($= p_H$)	pk_2 für 19,5° nach *Michaelis* und *Mizutani*
0	839,0	839,6	9,88	9,81
20	835,0	836,5	9,82	9,76
40	829,0	830,9	9,73	9,76
60	826,0	827,8	9,68	9,90
80	824,0	825,9	9,65	10,01

Die Löslichkeitsbestimmung wurde auf folgende Weise ausgeführt. Glykokoll von *Kahlbaum* wurde noch einmal aus heißem Wasser umkristallisiert. Nun wurde dieses in genügendem Überschuß zu den verschiedenen Lösungen zugegeben, also in der ersten Versuchsreihe zu den rein wässerigen Lösungen der in der ersten Spalte der Tabelle II genannten Elektrolyten, und geschüttelt. 40 Stunden Schütteln bei 35° erwies sich als ausreichend zur Einstellung des Gleichgewichts. Die minimale Löslichkeit im isoelektrischen Punkte ist, wie Versuche 5a, b, c in der Tabelle II zeigen, praktisch gleich, wenn man das Gemisch von der Zimmertemperatur aus direkt in das Schüttelbad von 35° bringt, oder wenn man es vorher durch starke Überwärmung bei etwa 50° in einen für 35° übersättigten Zustand bringt und dann bei 35° schüttelt. Zur Einstellung des isoelektrischen Punktes wurde ein Acetatpuffer benutzt. Wie man sieht, ist noch in ziemlicher Entfernung vom isoelektrischen Punkte (Versuch 4 mit 0,01 n HCl) die Löslichkeit noch nicht merklich verschieden davon.

Die Versuche 9 und 10 zeigen, daß Zusatz von NaCl im isoelektrischen Punkte die Löslichkeit nur sehr wenig beeinflußt und selbst in 2n NaCl-Lösung nur etwa um 7 Proz. verändert, und zwar erhöht.

Die verschiedenen p_H außerhalb des isoelektrischen Punktes wurden immer nur durch HCl oder NaOH hergestellt. Nach beendeter Schüttelung wurde die Lösung sofort in einem Luftthermostat von 35° durch ein gewöhnliches vorgewärmtes Filter filtriert. Innerhalb einer halben Minute konnte genügendes Filtrat für alle Analysen gewonnen werden. Das Filtrat wurde einerseits zur N-Bestimmung nach *Kjeldahl* benutzt, und zwar für drei parallele Analysen mit je 1 ccm des Filtrats, wobei zur Schlußtitration bei größerem N-Gehalt Methylrot als Indikator verwendet wurde, bei einem N-Gehalt $<$ 10 mg die jodometrische Methode nach *Bang* verwendet wurde. Eine andere Probe des Filtrats wurde für die p_H-Messung benutzt.

Für die alkoholischen Lösungen wurde dasselbe Verfahren angewendet. Zunächst wurde für jeden Alkoholgehalt die minimale

Tabelle II ***).

Ohne Alkohol.

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	mg N in 1 ccm Filtrat	mg N pro Liter (Mittelwert)	log Λ	log $\frac{\Lambda}{\lambda}$ beobachtet	log $\frac{\Lambda}{\lambda}$ berechnet	p_H ber.
1. 4n HCl	2,23	112,846 112,555 112,555	112 652	5,0517	0,4093	0,4063	2,25
2. 2n HCl	2,72	67,640 67,934 67,640	67 738	4,8309	0,1885	0,1832	2,70
3. 0,5n HCl . . .	3,32	49,854 49,854 49,708	49 856	4,6976	0,0529	0,0433	3,23
4. 0,01n HCl . . .	5,32	43,420 44,411 44,560	44 130	4,6413	0,0023	0,0004	4,66
5. 0,095n Na-Acetat, 0,05n Essigsäure	a) 6,03	44,549*) 45,030*) 44,442*)					
	b) 6,07	44,508**) 44,197**) 44,918**)	43 890 (= λ)	4,6444 (= log λ)	0		
	c) 6,06	42,096**) 42,818**) 42,408**)					
6. 0,5n NaOH . .	8,70	47,052 41,618 46,618	46 673	4,6691	0,0267	0,0290	8,79
7. 2n NaOH . .	9,35	59,758 59,758 59,374	59 630	4,7754	0,1330	0,1145	9,43
8. 5n NaOH . .	10,07	95,936 95,228 96,228	96 131	4,9928	0,3682	0,4060	10,01
Mit Zusatz von NaCl.							
9. 0,095n Na-Acetat 0,05n Essigsäure + 0,5n NaCl	6,04	45,422 45,422 44,988	45 288	4,6560	0,0060	—	—
10. Dieselbe Lösung + 2n NaCl	6,06	47,009 46,864 46,864	46 912	4,6712	0,0212	—	—
11. 0,5n NaOH + 2n NaCl	8,78	49,812 49,518 49,518	49 616	4,6957	0,0457	0,0334	8,92

*) Eingestellt aus vorher bei 50° gesättigter Lösung.

**) Einstellung von der Zimmertemperatur aus.

***) Anmerkung zu dieser und den folgenden Tabellen. Die Zahlen sind zum Teil mit mehr Dezimalstellen angegeben, als der Genauigkeitsgrenze der Methoden entspricht. Da ein Mißverständnis aber nicht möglich ist, so sind die versehentlich in dieser Form im Manuskript stehen gebliebenen Zahlen zur Erleichterung der Setzerarbeit bei der Korrektur nicht geändert worden.

Tabelle III. 20 Proz. Alkohol.

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	mg N in 1 ccm Filtrat	mg N pro Liter (Mittelwert)	log Λ	log $\frac{\Lambda}{\lambda}$ beobachtet	log $\frac{\Lambda}{\lambda}$ berechnet	p_H berechnet
1. 2n HCl	2,59	53,060 52,772 52,912	52 915	4,7237	0,3392	0,3559	2,62
2. 0,5n HCl	3,29	29,772 29,308 29,720	29 600	4,4713	0,0868	0,0972	3,35
3. 1n HCl	4,16	25,351 25,064	25 178	4,4011	0,0166	0,0161	4,11
4. 0,04n Na-Acetat 0,22n Essigsäure	6,06	23,628 23,918 25,181	24 242 (= λ)	4,3845 (= log λ)	0		
5. 0,5n NaOH . .	8,96	28,846 28,700 28,409	28 652	4,4572	0,0727	0,0561	9,08
6. 2n NaOH . . .	9,75	45,030 44,884 44,448	44 787	4,6512	0,2667	0,2677	9,75
7. 4n NaOH . . .	10,09	63,272 62,964 62,964	63 067	4,7998	0,4153	0,4569	10,03

Tabelle IV. 40 Proz. Alkohol.

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	mg N in 1 ccm Filtrat	mg N pro Liter (Mittelwert)	log Λ	log $\frac{\Lambda}{\lambda}$ beobachtet	log $\frac{\Lambda}{\lambda}$ berechnet	p_H berechnet
1. 2n HCl	2,56	27,076 27,220 26,788	27 029	4,4319	0,4782	0,4900	2,57
2. 0,5n HCl	2,88	17,176 17,030 17,176	17 118	4,2355	0,2798	0,3010	2,92
3. 0,1n HCl	3,76	9,950 9,956 10,096	10 001	4,0004	0,0467	0,0539	3,81
4. 0,01n HCl . . .	4,49	9,338 9,347 8,840	9 125	3,9621	0,0089	0,0107	4,56
5. 0,01n Na-Acetat 0,002n Essigsäure	6,01 5,91	8,868 9,022 9,022 8,552 8,994 9,526	8 989 (= λ)	3,9537 (= log λ)	0		
6. 0,1n NaOH . .	8,92	10,822 10,478 10,478	10 593	4,0429	0,0892	0,0626	9,09
7. 0,5n NaOH . .	9,53	15,319 15,162 15,008	15 163	4,1807	0,2270	0,2125	9,57
8. 2n NaOH . . .	10,04	32,434 32,294 32,000	32 243	4,5082	0,5545	0,4966	10,14

Tabelle V. 60 Proz. Alkohol.

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	mg N in 1 ccm Filtrat	mg N pro Liter (Mittelwert)	$\log \Delta$	$\log \frac{\Delta}{\lambda}$ beobachtet	$\log \frac{\Delta}{\lambda}$ berechnet	p_H berechnet
1. 0,5n HCl	2,75	10,744 10,456 10,605	10602	4,0253	0,5449	0,5035	2,69
2. 0,1n HCl	3,38	4,710 4,724 4,668	4701	3,6722	0,1948	0,1798	3,34
3. 0,01n HCl . . .	4,11	3,243 3,312 3,308	3288	3,5170	0,0396	0,0395	4,11
4. 0,02n Na-Acetat 0,011n Essigsäure	6,04	2,991 2,999 3,016	3002 (= λ)	3,4774 (= $\log \lambda$)	0		
5. 0,1n NaOH . .	9,05	4,020 4,056 4,037	4038	3,6062	0,1288	0,0823	9,22
0,1n NaOH . .	9,20	4,178 4,139 4,111	4143	3,6172	0,1399	0,1242	9,26
6. n NaOH	9,68	5,648 5,936 5,936	5842	3,7665	0,2891	0,3010	9,65
7. 2n NaOH . . .	10,23	14,174 14,034 14,034	14081	4,1485	0,6711	0,6269	10,25

Tabelle VI. 80 Proz. Alkohol.

Zusammensetzung der Lösungen	p_H	mg N in 1 ccm Filtrat	mg N pro Liter (Mittelwert)	$\log \Delta$	$\log \frac{\Delta}{\lambda}$ beobachtet	$\log \frac{\Delta}{\lambda}$ berechnet	p_H berechnet
1. 0,5n HCl	2,48	3,806 3,818 3,778	3801	3,5799	0,9424	0,9249	2,46
2. 0,1n HCl	3,01	1,579 1,572	1576	3,1976	0,5601	0,5041	2,93
3. 0,01n HCl . . .	3,83	0,5994 0,5865 0,5875	591	2,7718	0,1343	0,1242	3,79
4. 0,01n Na-Acetat 0,05n Essigsäure	6,14	0,430 0,437 0,435	437 (= λ)	2,6375 (= $\log \lambda$)	0		
5. 0,01n NaOH . .	8,88	0,4938 0,4971 0,4964	496	2,6953	0,0578	0,0679	8,80
6. 0,1n NaOH . .	9,74	0,9059 0,9013 0,9073	905	2,9566	0,3191	0,3489	9,69
7. n NaOH	10,37	3,139 3,117 3,117	3124	3,4948	0,8573	0,7960	10,44

.öslichkeit im isoelektrischen Punkte bestimmt, welche durch Acetat-
uffer hergestellt wurde. Hierbei mußte berücksichtigt werden, daß
rstens der isoelektrische Punkt des Glykokolls durch Alkohol etwas
erschoben wird, und zweitens, daß zur Herstellung eines bestimmten p_H
n alkoholischer Lösung die Zusammensetzung des Acetatpuffers anders
ein muß als in reinem Wasser, weil die Dissoziationskonstante der
Essigsäure durch Alkohol verändert wird. Erleichternd für die Be-
timmung des Löslichkeitsminimums ist auch hier wiederum der Um-
tand, daß eine breite isoelektrische Zone besteht und eine strenge
Innehaltung des isoelektrischen Punktes nicht erforderlich ist.

Es wurden Versuchsserien mit 20, 40, 60 und 80 Vol.-Proz. Alkohol
ausgeführt. Die minimale Löslichkeit des Glykokolls im isoelektrischen

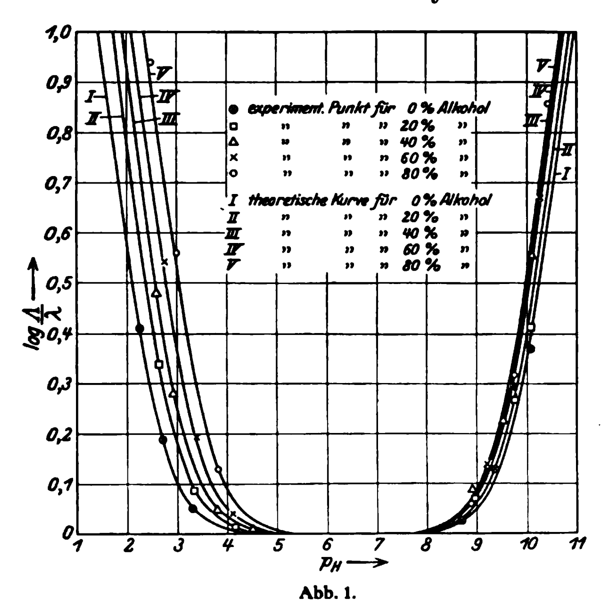


Abb. 1.

Punkte wurde durch Alkohol stark herabgedrückt, schon durch 20 Proz. Alkohol fast auf die Hälfte, durch 40 Proz. Alkohol auf $^1/_5$, durch 60 Proz. auf $^1/_{15}$, durch 80 Proz. ungefähr auf $^1/_{100}$. Trotz dieser großen Unterschiede stimmen die für verschiedene p_H berechneten, auf das jeweilige Löslichkeitsminimum bezogenen relativen Löslichkeiten recht gut mit den beobachteten überein.

Die Versuche sind graphisch in Abb. 1 wiedergegeben. Die ausgezogenen Kurven stellen die theoretisch berechneten relativen Löslichkeiten dar. Die Abszisse ist p_H, die Ordinate gibt die relative Löslichkeit Λ/λ, und zwar in logarithmischem Maßstab. Die Kurven wurden mit Benutzung der oben ermittelten Werte von k_1 und k_2 des Glykokolls

in alkoholisch-wässerigen Lösungen berechnet, Kurve I für einen Alkoholgehalt von 0 Proz., Kurve II für 20 Proz., Kurve III für 40 Proz., Kurve IV für 60 Proz. und Kurve V für 80 Proz. Auf der sauren Seite verlaufen die verschiedenen Kurven deutlich getrennt voneinander, weil k_1 durch Alkoholzusatz stark geändert wird, dagegen verlaufen die Kurven auf der alkalischen Seite sehr dicht nebeneinander, weil k_2 durch Alkohol nur wenig geändert wird[1]).

Die eingetragenen Punkte stellen die Resultate der Versuche dar, sie fügen sich den berechneten Werten recht gut ein. Besonders ist auffällig, daß auf der sauren Seite die korrespondierten Punkte bei verschiedenen Alkoholgehalten deutlich auseinander liegen, während sie auf der alkalischen Seite beinahe aufeinander fallen. In den Tabellen gibt die vorletzte Spalte den Wert von log Λ/λ an, wie es für das berechnete p_H zu erwarten wäre. Die letzte Spalte gibt das berechnete p_H an, welches theoretisch für den beobachteten Wert von Λ/λ erwartet werden muß. Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Werten ist in alkoholfreier Lösung noch besser als man zu erwarten berechtigt war. Bei alkoholischen Lösungen ist sie nicht so ganz gut, aber immer noch über Erwarten gut, insofern als die Abweichungen in logarithmischem Maße selten einige Einheiten der zweiten Dezimale übersteigen.

Hiermit ist gezeigt, daß man die aus dem einfachen Massenwirkungsgesetz abgeleitete Theorie der p_H-Abhängigkeit der Löslichkeit in wässerigen und alkoholischen Lösungen auf das Glykokoll weitgehend anwenden darf.

---

[1]) Siehe hierüber *Michaelis* und *Mizutani*, l. c.

Eine Mikro-auswasch-pipette.

Von

Karl Schuhecker.

(Aus dem physiologischen Institut der Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

(Eingegangen am 11. Februar 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Entbehrlichkeit einer Wage, vor allem aber die Raschheit, mit der Pipetten das Abmessen gestatten, haben auch in der Mikroanalyse, besonders bei Serienuntersuchungen, dem Abmessen von Flüssigkeiten eine gewisse Vorzugsstellung gegenüber dem Einwägen verschafft.

Die Methoden, die verschiedene Autoren beim Pipettieren anwenden, lassen sich nach zwei Gesichtspunkten ordnen: Die einen verzichten überhaupt darauf, die gesamte abgemessene Substanz aus der Pipette heraus zu bekommen, die anderen waschen nach entweder, indem sie zunächst die Probe aus der Pipette ausblasen und dann einfach Waschflüssigkeit nachsaugen[1]) oder aber folgendes Verfahren[2]) einhalten: Der nicht graduierte Schenkel der winklig gebogenen Kapillarpipette wird mittels Gummistopfens in den Hals eines Kölbchens eingesetzt. Der Hals trägt seitlich einen Ansatz, der, mit Gummischlauch versehen, zum Ansaugen der Probe in die Kapillarpipette dient. Hat man die gewünschte Flüssigkeitsmenge abgemessen, so wird sie zunächst in das Kölbchen gesaugt und hierauf die Pipette durch Nachsaugen von Waschflüssigkeit vollständig ausgewaschen. In die Kategorie der Auswaschpipetten gehört auch die *Pregl*sche Präzisionspipette[3]) für Mikrokjeldahlbestimmungen. Diese Pipette hatte ursprünglich oberhalb der Marke einen breiteren seitlichen Ansatz, in den die Spülflüssigkeit eingegossen wurde. Die Neuauflage der Pipette[4]) trägt keinen seitlichen Ansatz, sondern der oberhalb der Marke befindliche Teil ist bedeutend weiter als bei den gewöhnlichen Pipetten, so daß man die Waschflüssigkeit bequem eingießen kann.

Die ersterwähnte Art zu pipettieren hat den Nachteil, daß die Größe des Fehlers nur dann konstant ist, wenn immer die gleiche oder wenigstens

---

[1]) *H. C. Hagedorn* und *B. Norman Jensen*, diese Zeitschr. 135, 46, 1923.

[2]) *Z. Ernst* und *St. Weiss*, Wien. klin. Wochenschr., Jahrg. 34, Nr. 15, S. 174, 1921.

[3]) *F. Pregl* in E. A. Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod., Abt. V, S. 1347.

[4]) *Derselbe*, Die quantitative organische Mikroanalyse, S. 104. Berlin, J. Springer, 1917.

gleich konstruierte Pipetten mit gleich großer Wandoberfläche des Meßbereiches benutzt werden und wenn die abzumessenden Flüssigkeiten das gleiche spezifische Gewicht, die gleiche Viskosität und Adhäsion für Glas haben. Letzteres ist aber gerade bei biologischem Untersuchungsmaterial nicht der Fall. *R. Prigge*[1]) hat für die Mikrochloridbestimmung im Blute nach *I. Bang* eine Pipette angegeben, die 0,2 ccm faßt und in Kubikmillimeter eingeteilt ist. Das Lumen des zum Saugen dienenden Endes ist verengt, damit beim Ablassen der gewünschten Blutmenge die Blutsäule am entsprechenden Teilstrich festgehalten werden kann. *Prigge* erwähnt, daß für je 0,1 ccm Blut (etwa 105 mg) 2 bis 4 mg an der Pipettenwand haften bleiben; diese Menge entgeht also der Bestimmung.

H. C. Hagedorn und *B. Norman Jensen*[2]) spülen ihre 10 bis 12 cm langen Pipetten von 0,1 ccm nach Gebrauch gleich aus und verwenden sie nach Ausschleudern des Wassers zur neuerlichen Blutmessung. Die zurückgebliebene Wasserschicht bedinge nach ihren Untersuchungen keinen Fehler. Die angeführten Beispiele für die Genauigkeit ihrer Blutzuckerbestimmung gestatten kein Urteil über die Exaktheit dieser Art zu pipettieren, da sie die Fehler der gesamten Analyse in sich schließen. Es war daher notwendig zu untersuchen, wieviel Wasser nach dem Ausschleudern in der Pipette zurückbleibt und die Möglichkeit hat, sich mit dem Blute zu mischen. Ich habe die Pipette so ausgeschleudert, wie man dies mit dem Quecksilber der Fieberthermometer macht. Es blieben zurück:

nach 15maligem Ausschleudern einmal 1,4 Proz., ein andermal 1,3 Proz.,
nach weiterem 15maligem Ausschleudern 1,2 bzw. 1,0 Proz.,
" " 30 " " 0,8 " 0,6 "
" " 30 " " 0,8 " 0,5 "

Es waren demnach in diesem Falle 60 bis 90 Schleuderbewegungen nötig, um noch einen Rest von 0,5 bis 0,8 Proz. in der Pipette zu haben; hatte man jedoch nur 15mal geschleudert, so betrug die Menge des zurückgebliebenen Wassers das Doppelte. Diese Werte wurden durch Wägung gewonnen.

L. Pinkussen und *A. Floros*[3]) verwenden genau kalibrierte 0,1 ccm fassende Pipetten. Sie lassen das abgemessene Blut unter leichtem Blasen heraustropfen und blasen den Rest scharf aus. Die genannten Autoren geben ferner an, es sei nicht möglich, mit derselben Pipette öfter als dreimal hintereinander Blut aufzuziehen, da sonst das an den Wandungen haftende Blut eine Veränderung des Volumens hervorbringen würde; bei schnellem Arbeiten sei dies für die ersten Male nicht zu befürchten. Die angeführten Vergleichsanalysen mit eingewogenem Untersuchungsmaterial geben jedoch keinen Aufschluß über die Genauigkeit dieser Art zu pipettieren, da sie die Fehler der gesamten Analyse in sich schließen. Es war daher notwendig, ein Urteil über die Leistungsfähigkeit des Ausblasens zu gewinnen. Dies ist nicht einfach, weil beim Blasen die Unterbrechung desselben, um Atem zu holen, und die Stärke, mit der man bläst, subjektive, veränderliche Faktoren sind. Versuche mittels Wägung scheiterten aus dem Grunde, weil sich beim Blasen in der Pipette Wasserdampf kondensiert, der mitgewogen wird und so zu ganz falschen Resultaten führt. Als gangbar erwies

---

[1]) *R. Prigge*, diese Zeitschr. **130**, 442, 1922.
[2]) *H. C. Hagedorn* und *B. Norman Jensen*, diese Zeitschr. **137**, 92, 1923.
[3]) *L. Pinkussen* und *A. Floros*, diese Zeitschr. **125**, 42, 1921.

sich für das Verhalten von Blut die Bestimmung seines Gesamtstickstoffs nach *Kjeldahl* unter Benutzung der jodometrischen Titration nach *I. Bang*, die unter bestimmten Kautelen brauchbare Ergebnisse liefert. Das Verhältnis Stickstoff der gesamten abgemessenen Menge zum Stickstoff des Rückstands in der Pipette gibt ein verwertbares Maß für die zurückgehaltene Blutmenge. Die Pipette wurde während des Ausblasens senkrecht mit der Spitze nach unten gehalten und gleich nach Beendigung desselben das zurückgebliebene Blut durch wiederholtes Durchspülen mit destilliertem Wasser nach längerem Verweilen desselben in der Pipette und sodann mit der zur Veraschung nötigen Menge konzentrierter Schwefelsäure entfernt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt. Sie lehren, daß

Tabelle I.

Versuchsreihe	Länge der Pipette cm	Länge des Meßbereiches der Pipette cm		Relativer Widerstand der Pipette mit bzw. ohne Schlauchverbindg.[1]	[2]	Jedesmalige Dauer des Blasens Sek.	Zimmertemperatur °C	Rückstand an Blut Proz.	Rückstand an Jodatlösung Proz.
1	11,5	8,3	Pipette ohne Schlauch	103	I	30	14—15	0,64	0,00, 0,025, 0,00
					I	30	30	1,39, 1,13	0,025, 0,05, 0,125
2			Pipette mit 13 cm langem Schlauch versehen	105,5	I	30	14—15	1,79	0,05, 0,025
					I	60	14—15	0,17	0,00, 0,00, 0,00
					III	60	14—15	0,09	
					I	60	30	1,15	0,15
3			Pipette mit 35 cm langem Schlauch versehen	108,5	I	30	14—15	2,56	
					I	60	14—15	1,19	0,15, 0,25, 0,125
					II	60	14—15	1,36	
					III	60	14—15	1,49	
4	22	8,3	Pipette ohne Schlauch	109	I	30	14—15		0,175
					I	45	14—15	0,69, 0,45	0,075, 0,025
					II	45	14—15	0,13	
					I	45	30	1,00	0,075, 0,15
5	25	8,3	Pipette mit 35 cm langem Schlauch versehen	118	I	60	14—15	1,73, 1,83	
					II	60	14—15	2,49	
					III	60	14—15	3,39	
6	24,5	8,1	Pipette ohne Schlauch mit sehr enger Spitzenöffnung	582	I	30	14—15		0,50, 0,70
					I	60	14—15		0,5
					I	120	14—15		0,25, 0,25
					I	60	30		0,525
					Rückstände nach einfachem Ausfließenlassen:				
					60 Sek. nach Beendigung desselb.				0,725
					120 „ „ „ „				0,650

[1]) Gemessen an der Ausflußgeschwindigkeit von Wasser. Die lichte Weite der verwendeten Schläuche betrug 1 mm.

[2]) *Ein* Strich in dieser Rubrik gibt an, daß die Pipette nach Entfettung mit Chromschwefelsäure oder Alkohol und Äther *ein* Mal benutzt wurde; *zwei* Striche, daß die Pipette nach der einmaligen Benutzung noch ein *zweites* Mal ohne vorherige Reinigung verwendet wurde; *drei* Striche, daß sie wieder ohne Reinigung noch ein *drittes* Mal zum Abmessen diente.

Die ganz niedrigen Werte in der letzten Spalte sind nur Näherungswerte, da z. B. 0,025 Proz. 0,005 ccm der n/200 Natriumthiosulfatlösung, mit der titriert wurde, entsprechen.

mit der Länge der Verbindungsstrecke zwischen Meßbereich und Mund die Rückstände bedeutend stärker anwachsen, als es der Vergrößerung der Widerstände entspricht. Es scheint auch nicht gleichgültig zu sein, ob die Verbindung nur aus Glas oder aus Glas und Schlauch besteht. Ferner zeigt sich bei verschieden langer Verbindungsstrecke eine auffallend verschieden große Abhängigkeit von der Blasdauer; während bei langem Schlauch deren Verdoppelung nur zur Entfernung ungefähr der Hälfte des der einfachen Blasdauer entsprechenden Blutrestes führt, wird bei kurzem Schlauch die Pipette nahezu vollständig blutfrei. Beide Erscheinungen erklärt folgender Versuch: Bläst man in eine lange Glaskapillare mit verengter Spitze hinein, so schlägt sich vom Mundende bis zur Spitze fortschreitend Kondenswasser in der Kapillare nieder, das sich allmählich zu Tröpfchen vereinigt, welche schließlich durch die Spitze ausgeblasen werden und auf dem Wege dahin die Kapillare auswaschen. Die gleiche Erscheinung findet in der Pipette statt. Im Beginn des Blasens, wo nur die Niederschläge im Meßbereich bei der Aufräumung der Rückstände mithelfen, wird sich an denselben weit weniger ändern als später, wenn das oberhalb der Marke befindliche Kondenswasser, das dem folgenden den Weg bahnt, in Fluß gerät und den Meßbereich überschwemmt. Dann hat man es aber nicht mehr mit „Ausblasen" allein zu tun, sondern auch mit „Auswaschen" und die Lungenluft ist der Lieferant des hierzu notwendigen destillierten Wassers.

Es lag daher nahe, den Einfluß der Temperatur auf die Größe des Rückstands zu untersuchen. Die mit dem kurzen Schlauch armierte Pipette (s. Tabelle I, Versuchsreihe 2), die bei 15° Zimmertemperatur nach 1 Minute langem Blasen 0,17 Proz. Blut zurückhielt, verwehrte bei 30° und gleicher Blasdauer 1,15 Proz., also dem siebenfachen, den Austritt; selbstverständlich, denn bei dieser Temperatur wurde weit weniger Wasserdampf in der Pipette niedergeschlagen. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich, als in die Pipetten direkt, ohne Schlauchverbindung hineingeblasen wurde (Versuchsreihe 1 und 4).

Ich habe versucht, mittels Wägung die Wirkung der reinen Luftströmung unter Ausschaltung von Verdunstung und Kondensation zu bestimmen, indem ich mit einer Kapselpumpe unter einem konstanten mit Hilfe eines Quecksilberüberlaufventils regulierten Druck von 7 cm Quecksilber, solche Mengen Wasserdampf enthaltende Luft durch die Pipette leitete, daß bei einer Kontrolle keine Gewichtsänderung auftrat. Diese Untersuchungen, die nicht leicht auszuführen sind, ergaben unter anderem, daß bei einer Pipette, wie in Versuchsreihe 1, nach 30 Sekunden langem Durchleiten der Luft etwa 2,3 Proz., nach 60 bis 90 Sekunden langem etwa 1,1 Proz. zurückgehalten werden, ein Wert, der dem beim Ausblasen mit dem Munde bei 30° gefundenen entspricht.

Ich habe ferner den Einfluß des wiederholten Aufsaugens von Blut in die bereits einmal benutzte und nicht wieder gereinigte Pipette studiert. Es wurde jedesmal 60 bzw. 45 Sekunden lang geblasen und sofort hernach wieder Blut aufgesaugt. Die Resultate sind in der Tabelle I eingetragen. Die Pipette mit der langen Schlauchverbindung und dem großen Rückstand weist nach jeder wiederholten Benutzung ein beträchtliches, die mit der mäßig langen Schlauchverbindung und dem geringeren Rückstand ein mäßiges Ansteigen desselben, die Pipette mit dem kurzen Schlauch dagegen, die schon nach der ersten Verwendung fast entleert war, nach dreimaligem Gebrauch ein noch etwas geringeres Residuum auf als bei der erstmaligen

enutzung; daß letzteres kein zufälliges Ergebnis ist, beweist das dies-
ezüglich noch ausgeprägtere Verhalten der langen Pipette ohne Schlauch
ı Versuchsreihe 4. Pipetten ohne Schlauchverbindung verhalten sich
emnach anscheinend etwas anders als solche mit Schlauch; in geringerem
laße war dies auch in den früheren Untersuchungen kenntlich. Die Er-
lärung hierfür ist: Am Ende des erstmaligen Ausblasens war das Kondens-
'asser oberhalb der Marke noch nicht in Bewegung geraten oder befand
ch zum mindesten noch zum Teil innerhalb des Meßbereichs, beim zweiten
usblasen jedoch beteiligten sich am Ausschwemmen die ganzen in der
'ipette noch von früher vorhandenen und die gesamten während des Blasens
och hinzugekommenen Niederschläge. Wenn jedoch eine Pipette mit
inem Schlauch versehen ist, so bildet vor allem die Verbindungsstelle des
chlauches mit dem Glase eine Barriere gegen das Vorwärtsgleiten des
on oben kommenden, im Schlauch kondensierten Wassers. Versuche
ei 30° habe ich wohl unternommen, doch kam es schon beim zweiten Auf-
augen so häufig zu Gerinnungen in der Pipette, daß ich auf eine Bestimmung
ler Rückstände verzichtete.

Ich habe ferner das Verhalten einer nicht so viskosen und zur Ge-
innung neigenden Flüssigkeit wie Blut und zwar einer n Kaliumjodat-
ösung in derselben Weise geprüft. Die gefundenen Prozentsätze, die
atürlich viel niedriger sind, zeigen im Wesen das gleiche Verhalten wie
3lut. Die Werte wurden durch Titration mit n/200 Natriumthiosulfat-
ösung ermittelt. Sie sind in der Tabelle I zusammengestellt. Besonders
eigt sich auch hier wieder das Ansteigen der Rückstände mit zunehmender
Temperatur, obwohl die Viskosität bei Temperaturzunahme sinkt. Größere
Neigung des Blutes zur Gerinnung kann daher wenigstens nicht allein
Schuld sein an den hohen Blutrückständen bei 30°.

Außer der Dichte, der Viskosität und der Adhäsion an Glas kommen
lemnach beim Ausblasen von Pipetten eine Reihe weiterer Einflüsse auf
lie Größe des Rückstands in Betracht: 1. Die Geschwindigkeit des Luft-
troms; sie ist abhängig von der Blasstärke und vom Widerstand in der
Pipette. 2. Die Menge des mit der Atemluft eingeführten Kondenswassers
ınd die Temperatur der Pipette. 3. Die Länge des Weges vom Munde bis
zum Meßbereich der Pipette und die Art der Verbindung. 4. Die Dauer
les Blasens.

Unter geeigneten Bedingungen — weite Spitzenöffnung vor allem,
Kürze der Verbindungsstrecke zum Munde, niedrige Temperatur, kräftiges
ınd genügend langes Blasen — kommt das Ausblasen von Pipetten
lem Auswaschen gleich und nur dann sind die mit ihnen gemachten
Messungen brauchbar. Wiederholtes Pipettieren von Blut mehrmals hinter-
einander mit derselben Pipette ist trotzdem abzuraten, da das in ihr ver-
bliebene Kondenswasser die Genauigkeit der folgenden Messung beein-
trächtigt (es können mehrere Milligramm Wasser im Meßbereich verbleiben).
Unter den gegenteiligen Bedingungen — besonders bei sehr enger Spitzen-
öffnung — unterscheidet sich das Ausblasen nicht viel vom Ausfließen
unter dem Einfluß der Schwere, wie aus der Versuchsreihe 6 hervorgeht.

Die zweite Methode hat den Nachteil, daß nach dem Ausblasen der
Pipette häufig Substanzreste an der Pipettenspitze hängen bleiben und
dann beim Eintauchen derselben in die Waschflüssigkeit verloren gehen
können. Bei Verwendung von Waschmitteln, die mit der zu unter-
suchenden Substanz Niederschläge bilden, versagt diese Methode in
vielen Fällen.

Am exaktesten arbeitet man mit der *Pregl*-Pipette, bei der die beste und sicherste Art des Auswaschens, das Durchspülen von der Mundseite her, Anwendung findet und der von *Z. Ernst* und *St. Weiss*[1]) angegebenen und auch von *St. Rusznyák*[2]) verwendeten Technik. Diese Methode gestattet überdies das Durchspülen auch mit fällenden Flüssigkeiten infolge der hohen Geschwindigkeit, mit der das Waschmittel durch die Pipette gesaugt werden kann; doch erfordert sie die Beschaffung eigener Kölbchen, die mit der Pipette armiert, wenig stabil sind.

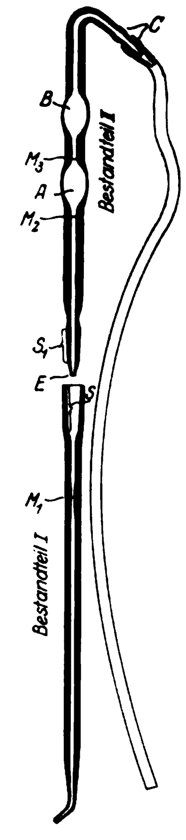


Abb. 1.

Von einer Mikropipette für biologische Zwecke kann man verlangen:

1. Genaue Kalibrierung; zur Überprüfung dient Auswägen mit reinem Quecksilber unter Berücksichtigung der Temperatur.
2. Die abgemessene Substanz muß aus ihr vollständig entfernt werden können.
3. Die Pipette soll das Auswaschen mit gemessenen ganz kleinen und auch größeren Flüssigkeitsmengen ermöglichen.
4. Das Auswaschen soll möglichst rasch nach dem Abmessen erfolgen können, um beim Pipettieren von Blut die Gerinnung zu vermeiden.
5. Die Strömungsgeschwindigkeit soll groß sein, damit man unter Umständen auch Niederschläge erzeugende Substanzen zum Waschen verwenden kann.

Ich beschreibe im folgenden eine Pipette, die ursprünglich für 0,1 bis 0,15 ccm Flüssigkeit bestimmt, sich entsprechend dimensioniert und kalibriert, für die Abmessung kleiner Flüssigkeitsmengen überhaupt geeignet erwiesen hat. Sie besteht aus zwei gläsernen Teilen, die aufeinander eingeschliffen sind. Bestandteil I (Abb. 1) ist die eigentliche Meßpipette, Bestandteil II ist der Behälter für die Waschflüssigkeit. Bestandteil I besteht aus einem dickwandigen Kapillarrohr von höchstens 1,0 bis 1,3 mm lichter Weite, dessen Spitze etwa 6 mm vor ihrem Ende um 45° abgebogen und erst jenseits der Biegung etwas stärker ausgezogen ist. Die bauchige Form, wie sie sonst Vollpipetten zeigen, wurde deshalb nicht verwendet, weil die Strömungsgeschwindigkeit im Bereich der Ausweitung beträchtlich abnimmt. Zur genaueren Eichung ist die Kapillare an der Marke M_1 (Abb. 1) auf eine kurze Strecke hin eingeengt. Eine zu starke Einengung ist ebenso wie eine zu enge Spitzenöffnung zu vermeiden, da dies gleichfalls die Strömungsgeschwindigkeit sehr beeinträchtigt. Bei der eben angeführten lichten Weite des Kapillarrohres war an diesen Engen ein Durchmesser von 0,5 mm ausreichend. Am anderen Ende, etwa 2 cm von der Marke M_1 entfernt, ist der Bestandteil I an seiner Innenwand mit einem leicht konischen Schliff

[1]) *Z. Ernst* und *St. Weiss*, Wien. klin. Wochenschr., Jahrg. 34, Nr. 15, S. 174, 1921.

[2]) *St. Rusznyák*, diese Zeitschr. 114, 23, 1921.

versehen, auf den die Spitze des Bestandteils II S_1 eingeschliffen ist. Bestandteil II (Abb. 1) besteht aus einem dickwandigen Kapillarrohr mit zwei größeren kugeligen Erweiterungen A und B. Das eine Ende trägt den bereits erwähnten Schliff S_1. Es ist jedoch nicht die ganze Spitze in den Schliff einbezogen, sondern ihr letztes Endchen E ist etwas ausgezogen und ragt bei der zusammengesetzten Pipette frei in das Schliffende des Bestandteils I hinein (Abb. 2). Der Lichtungsdurchmesser des Endchens beträgt etwa 0,6 mm. Ungefähr in der Mitte, miteinander durch ein etwa 1,5 cm langes Stück Kapillarrohr verbunden, befinden sich die Erweiterungen A und B, deren Wand in die der angrenzenden Kapillaren nicht scharf abgesetzt, sondern konisch übergeht. Hinter der zweiten Kugel B ist das Kapillarrohr spitzwinkelig abgebogen und mit ein oder zwei kleinen Aufblasungen C versehen, um dem hier angebrachten dünnen, leicht komprimierbaren Druckschlauch von etwa 1,5 mm lichter Weite, der zum Ansaugen und Ausblasen dient, einen besseren Halt zu geben. Das Stück Kapillare von der Spitze E bis zur ersten Kugel A ist ungefähr 5,5 cm lang, hat einen Fassungsraum von 0,15 bis 0,20 ccm, trägt eine diesbezügliche Marke M_2 und eventuell noch Unterteilungen. Das Kapillarstück zwischen den beiden Kugeln weist näher der Kugel A gleichfalls eine Marke M_3 auf; bis dorthin faßt der Bestandteil II 0,5 oder 1,0 ccm. Die zweite Kugel B dient nicht zum Messen, sondern nimmt beim Aufsaugen der abzumessenden Substanz einen Teil der Waschflüssigkeit auf. Die Schliffe, die nicht eingefettet werden dürfen, stellen bei guter Ausführung eine haltbare Verbindung der beiden Bestandteile her, so daß sie sich auch bei freihängender Pipette und selbst beim kräftigsten Hineinblasen in dieselbe nicht voneinander trennen.


Abb. 2.

Zum Gebrauch wird die Pipette zunächst auseinandergenommen. Will man mit wenig Flüssigkeit waschen, so saugt man in die Kapillare des Bestandteils II die gewünschte Menge Waschmittel; will man mit mehr Flüssigkeit spülen, so füllt man auch noch die erste Kugel A bis zur Marke M_3. Das Austreten des eingesaugten Waschmittels verhindert man am besten, indem man diesen Pipettenteil rasch in Horizontallage bringt. Hierauf stellt man seine Verbindung mit dem Bestandteil I her, und zwar so, daß das umgebogene Ende des Bestandteils II aufwärts, die Spitze des Bestandteils I abwärts gerichtet ist; diese Stellung ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die derart mit Waschflüssigkeit beschickte Pipette soll auch weiterhin horizontal gehalten werden, um das Eindringen von Flüssigkeit in den Bestandteil I zu vermeiden, dessen Meßbereich unbedingt trocken bleiben muß. (Man kann sie aber immerhin bis zu einem Winkel von fast 45° neigen, ohne daß die Waschflüssigkeit austritt, da dies das freie Hineinragen des Endchens E in den Bestandteil I erschwert.) Abklemmen des Gummischlauchs leistet dieselben Dienste. Bei Serienuntersuchungen kann man sich eine Reihe von Pipetten auf diese Weise vorbereiten, die bis zur weiteren Verwendung auf eine wagerechte Unterlage gelegt werden. Saugt man nun bei der Abmessung die zu untersuchende Substanz in den Bestandteil I, so zieht sich entsprechend der dadurch bewirkten Luftverdrängung ein Teil der Waschflüssigkeit je nach der verwendeten Menge in die erste Kugel A bzw. zweite Kugel B zurück. Im Beginn tritt die Flüssigkeit mit einem kleinen Ruck, den man bei viskosem Material wie Blut kaum merkt, in die Pipettenspitze ein, dringt dann aber vollständig gleichmäßig weiter, so daß ein genaues Anfüllen bis zur Marke mit Leichtigkeit gelingt. Es ist

übrigens unnötig zu saugen, da bei passender Neigung der Pipette, vorausgesetzt, daß sie tadellos gereinigt ist, die Flüssigkeit von selbst eindringt und weiter gleitet. Hat man die gewünschte Menge der zu untersuchenden Substanz in der Pipette, so reinigt man ihre Spitze, senkt sie und bläst die Probe zusammen mit der Spülflüssigkeit aus. Die Menge des Waschmittels und die Raschheit, mit der es ausgespritzt wird, richtet sich unter anderem danach, ob man fällende oder nicht fällende Spülmittel benutzt. Bei nicht fällenden Waschflüssigkeiten genügen kleine Mengen davon und das Durchspülen soll langsam erfolgen, um einen längeren Kontakt und eine bessere Durchmischung mit der Probe zu ermöglichen; bei fällenden Flüssigkeiten ist rasches Auswaschen mit einer größeren Flüssigkeitsmenge am Platze.

Bei Serienbestimmungen ist es nicht notwendig, eine große Anzahl vollständiger Pipetten zu besitzen. Es genügt ein einziger Bestandteil II, dagegen sind mehrere auswechselbare Bestandteile I erforderlich, die natürlich alle den gleichen zum Bestandteil II passenden Schliff haben müssen. Die Übereinstimmung der Volumina ist durch Auswägen mit Quecksilber zu prüfen. Ein einheitlicher Schliff wird mitunter auch angezeigt sein, wenn man einen Satz verschieden kalibrierter Bestandteile I oder verschieden große Mengen Waschmittel fassender Bestandteile II benötigt. Hat man die abzumessende Substanz, z. B. 0,1 ccm, nach dem Abmessen auf ein größeres Volumen, etwa 10 bis 20 ccm zu bringen, so wird es sich häufig empfehlen, dem Meßbereich des Bestandteils II einen um 0,1 ccm kleineren Fassungsraum, in diesem Falle also 9,9 bzw. 19,9 ccm, zu geben und mit dieser Menge Flüssigkeit, mit der sonst aufgefüllt würde, nachzuwaschen. Man erspart sich auf diese Weise das Auffüllen im Meßkolben und die Abmessung ist mindestens ebenso genau; die Distanz zwischen der Spitze E und der Marke des Bestandteils II soll auch bei großem Fassungsraum 8 cm nicht überschreiten. Bei der Eichung ist zu berücksichtigen, daß in dem sehr kleinen toten Raum um das Endchen E etwas Waschflüssigkeit nach dem Ablassen derselben zurückgehalten wird.)

Das Trocknen gereinigter Pipetten [1]) — es kommt dabei besonders auf den Bestandteil I an — besorgt man am besten, indem man mit der Wasserstrahlpumpe Luft durch die ganze Pipette saugt. Wasserreste in der Gegend der Schliffe, die unbedingt trocken sein müssen, lassen sich rasch entfernen, wenn man mit der Spitze des Bestandteils II, der mit der laufenden Wasserstrahlpumpe in Verbindung bleibt, die feuchten Stellen absucht. Auf diese Weise gelingt es in wenigen Sekunden, den Bestandteil I vollkommen zu trocknen.

Ich habe beobachtet, daß sich der Schliff, nach längerem Gebrauch der Pipette glättet und dann nicht mehr die sichere Bindung der beiden Bestandteile gewährleistet. Leichtes Aufrauhen mit feinem Schmirgel oder Schmirgelpapier beseitigt diesen Übelstand.

Zusammenfassung.

Es wurde eine Auswaschpipette zum Abmessen kleiner Flüssigkeitsmengen angegeben. Eine Auswaschpipette deshalb, weil nur das Auswaschen der gemessenen Substanz aus der Pipette Genauigkeit

---

[1]) Man reinigt am besten mit Chromschwefelsäure und behandelt damit auch die Schliffe und ihre Umgebung.

ler Messung verbürgt. Die Pipette ist dadurch charakterisiert, daß ie aus zwei aufeinander eingeschliffenen Teilen besteht, von denen ler eine zum Abmessen der Substanz, der andere zum Auswaschen lerselben, und zwar von der Mundseite der Pipette her mit gleichfalls nittels der Pipette abmeßbaren, sehr kleinen und auch größeren Flüssigkeitsmengen dient. Ein Einheitsschliff ermöglicht es bei Serienbestimmungen, den zum Abmessen der Substanz dienenden Bestandteil rasch durch einen gleich oder anders kalibrierten zu ersetzen. Die Auswechselbarkeit des zum Auswaschen dienenden Bestandteils gestattet bei entsprechender Eichung desselben, die abgemessene Substanz zugleich mit der zum Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen notwendigen Menge Waschflüssigkeit durchzuspülen. Hierdurch entfällt das Auffüllen im Meßkölbchen. Die Pipette ist derart konstruiert, daß vielfach auch fällende Waschmittel benutzt werden können. Da die Waschflüssigkeit unmittelbar nach dem Abmessen der zu untersuchenden Substanz zugleich mit dieser ausgeblasen wird, ist beim Pipettieren von Blut die Gefahr der Gerinnung auf ein Minimum herabgesetzt.

Beiträge zu einer Pharmakologie der Konzentrationsänderungen.

IV. Mitteilung:

Über Anionenwirkungen.

Von

L. Jendrassik und **L. Antal.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 23. Februar 1926.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In der ersten und dritten Mitteilung beschrieben wir eine *vorübergehender* Wirkungen, welche verschiedene Kationen am und Uterus verschiedener Säuger hervorrufen (1) (2). Da ein gehende Kentnnis derselben aus dem Gesichtspunkt ihrer Erk von Interesse ist, breiteten wir die Versuche auch auf andere Ag aus. Untenstehend seien die Wirkungen beschrieben, welche Anionen am überlebenden Kaninchendarm hervorrufen. (Eine gehende Untersuchung verschiedener Anionen am Darm wurde unseres Wissens nach — bisher noch nicht unternommen.)

Mit der Benennung „Anion“ soll hier nicht gesagt werden, daß die untersuchten Säuren eben nur in dieser Form wirken. Es ist ebenso möglich (besonders bei den Salzen schwächerer Säuren), daß das hydrolytisch abgespaltene undissoziierte Säuremolekül das wirksame Agens ist.

Bezüglich der angewandten **Methodik** soll nur erwähnt werden, daß wir auch hier ein nach *Magnus* isoliertes Dünndarmstückchen des Kaninchens untersucht haben. Im übrigen wurden die Versuche in der beschriebenen Versuchsanordnung ausgeführt (1). Die erwähnten Gaben beziehen sich auf 75 ccm Tyrodelösung. Diese enthielt in diesen Versuchen gewöhnlich kein Mg und kein Phosphat. Das untersuchte Anion wurde in Form seines Natriumsalzes angewendet. In einem Teile der Versuche wurden diese in geeignet konzentrierten Lösungen der Umspülflüssigkeit zugefügt. In anderen Versuchen wurden Bruchteile des Natriumchlorids durch isotonische Mengen des untersuchten Salzes ersetzt.

Hinsichtlich der angewandten terminologischen Ausdrücke müssen wir auch auf die erste und dritte Mitteilung verweisen.

Die beschriebenen Versuche wurden im Herbst 1924, zum Teil 1925 ausgeführt.

Versuchsergebnisse.

Zur Untersuchung gelangen die Anionen Br, J, F, SCN, SO_4, NO_2, NO_3, Oxalat, Citrat, OH. Die Richtung der Wirkungen erwies sich *bei allen untersuchten Anionen als gleich*, Unterschiede zeigten sich nur in quantitativer Hinsicht.

Ersetzt man $^1/_4$ bis $^1/_2$ Teil des NaCl mit entsprechender Konzentration von NaBr, NaJ, Na_2SO_4, so kommt eine deutliche oder starke vorübergehende Kontraktur des Darmes zustande. Bei 25prozentiger Substitution bleibt die Wirkung oft aus; wird aber die Hälfte des NaCl mit fremdem Salz ersetzt (also neben 0,4 Proz. NaCl, 0,705 Proz. NaBr bzw. 1,03 Proz. NaJ bzw. 0,65 Proz. Na_2SO_4, wasserfrei), so ist

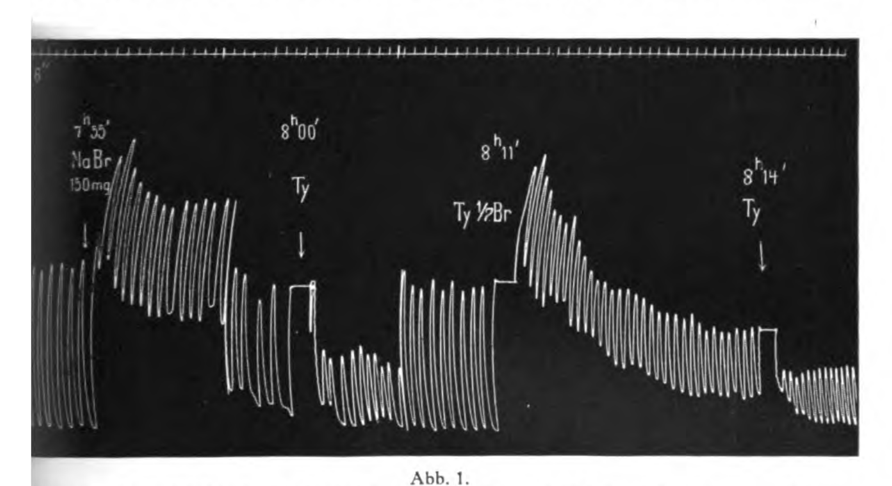


Abb. 1.

Kaninchendarm (18. Oktober 1924.) Wirkung von NaBr. — Bei NaBr wird es in 10proz. Lösung zur Tyrodeflüssigkeit gefügt. Ty = frische Tyrodelösung. — Ty $^1/_7$ Br = Tyrodelösung, in welcher $^1/_7$ Teil des NaCl mit äquivalentem NaBr ersetzt ist.

die Kontraktur immer sehr ausgeprägt, oft von maximaler Stärke (s. Abb. 1 und 2). Dabei leiden die Spontanbewegungen, die Amplituden werden kleiner, die Bewegungen unregelmäßig. Bromid und Jodid scheinen weniger schädlich als Sulfat zu sein. An einem Darm, an welchem bei Substitution mit $^1/_2$ NaBr die Bewegungen nur wenig gelitten haben, wurden diese in der Lösung mit $^1/_2$ Na_2SO_4 sehr klein und unregelmäßig. (Hier kann aber auch der Zuwachs an Na-Ionen eine Wirkung haben, da isosmotische Mengen von Na_2SO_4 relativ mehr Na-Ionen enthalten.)

Bei Rückkehr auf normale Tyrodelösung zeigt sich eine vorübergehende Lähmung (oder Verkleinerung der Amplituden), welche 1 bis 5 Minuten zu dauern pflegt.

Ersetzt man die ganze Menge des NaCl mit einem dieser Salze, so kommt die Kontraktur auch zustande; die Spontanbewegungen verschwinden aber sofort.

Analoge Wirkungen findet man bei der Substitution mit $NaNO_2$ und $NaNO_3$, nur die Stärke der Augmentations- und Diminutionswirkungen sind verschieden. Beim Ersetzen der Hälfte des Natriumchlorids mit äquivalenter Konzentration von Natriumnitrit ist die vorübergehende Kontraktur weniger hoch als beim Br, J oder SO_4, auch die Spontantätigkeit leidet nur wenig. Bei Rückkehr auf normale

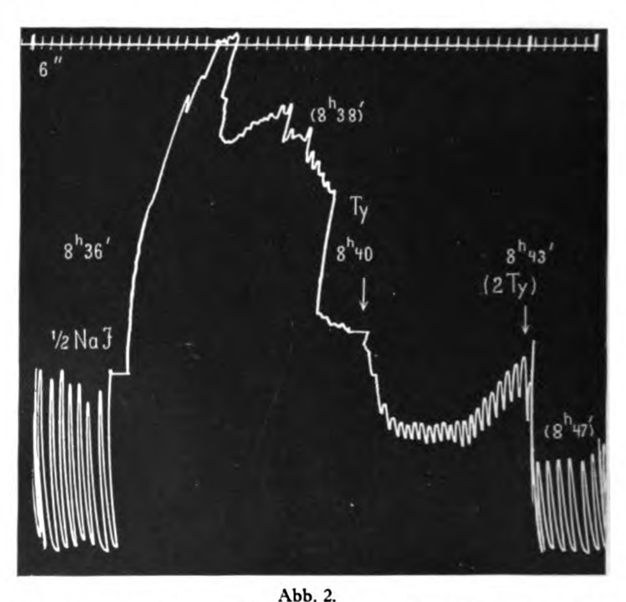


Abb. 2.
(18. Oktober 1924.) Wirkung von Substitution der Hälfte des NaCl der Tyrodelösung mit NaJ. — 2. Ty = zweites Auswaschen mit normaler Tyrodelösung.

Tyrodelösung ist aber die vorübergehende Lähmung viel stärker ausgeprägt und länger anhaltend. Bei völliger Substitution liegen die Verhältnisse auch ähnlich (Abb. 3).

Das *Nitrat* ist für den Darm auch nur wenig schädlich. Ersetzt man das NaCl *ganz* mit $NaNO_3$, so ist die zustandekommende Kontraktur gewöhnlich klein oder mittelstark. Bei halber Substitution fehlt es oft auch gänzlich; die Bewegungen sind auch nach Ablauf einer Viertelstunde vollkommen regelmäßig, höchstens büßen sie in ihrer Größe etwas ein. Bei Rückkehr zur normalen Tyrodelösung ist die vorübergehende Tonussenkung und das Kleinerwerden der Bewegungen nur mäßig ausgeprägt.

Ob diese Wirkung vom fremden Anion ausgelöst wird, oder ob diese durch eine Abnahme der Chlorionkonzentration zustande kommt, suchten wir durch Zufügen von Kochsalz zu entscheiden. In genügender Konzentration (150 bis 200 mg auf 75 ccm Tyrodelösung) wirkt NaCl erregend (2). Würde aber der Darm bei der Substitution eines Teiles des Kochsalzes durch NaBr, NaJ usw. durch eine Abnahme der Cl in Kontraktur geraten, so sollte diese Wirkung durch Zufügen geeigneter Gaben NaCl zu hemmen sein, wahrscheinlich schon durch Abnahme an sich unwirksamer Dosen. Der Versuch zeigt aber, daß das NaCl diese Kontrakturen nicht hemmt, es wirkt sogar viel stärker

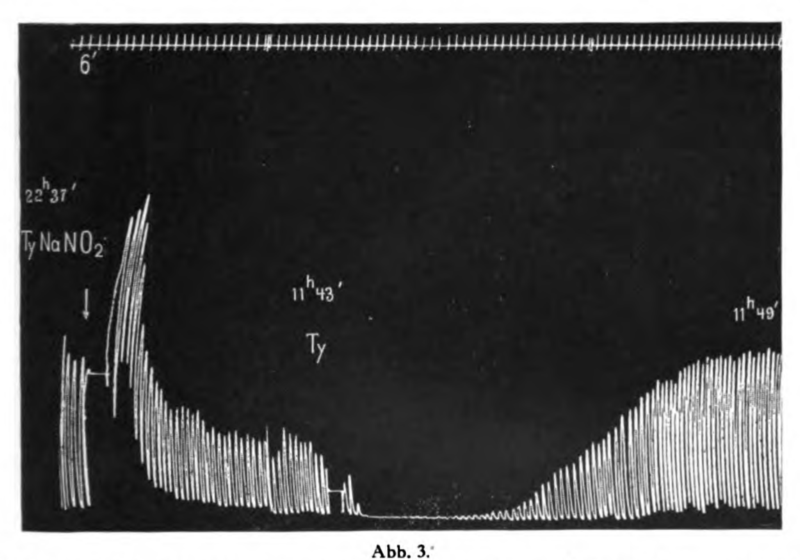


Abb. 3.

(31. Oktober 1924.) Die Wirkung von Nitrit-Tyrode (in welcher das NaCl vollständig mit $NaNO_2$ ersetzt ist = $TyNO_2$). Ty = Wechsel auf normale Tyrodelösung.

erregend als in normaler Lösung. Die Nitratkontraktur z. B. wird durch Zufügung von Kochsalz noch mehr verstärkt (s. Abb. 5). Dies beweist mit genügender Wahrscheinlichkeit, daß die Ursache der Erregung bei der Substitution nicht die Cl-Abnahme sein kann.

Untersucht man die Wirkung dieser Salze auf andere Weise, indem man das NaCl nicht durch diese ersetzt, sondern diese *der normalen Tyrodelösung zufügt*, so erhält man ähnliche Wirkungen. Beim Zufügen vorübergehende Zunahme der Bewegungsgröße bzw. Kontraktur; beim Auswaschen vorübergehende Hemmung. Die Spontanbewegungen werden durch solche Gaben nicht geschädigt.

Beim NaBr war die Wirkung — entgegen den anderen Salzen — nicht an jedem Darme mit der oben beschriebenen identisch. An einem

Darm riefen die üblichen Dosen keine Wirkung hervor, in einem anderen Falle war die Richtung der A- und D-Wirkung eben umgekehrt.

In einem Versuch hatte das Na Br (2 ccm einer 10proz. Lösung) eine ebenso starke Wirkung, wie wenn ein Teil des Na Cl mit derselben Menge (200 mg) Na Br ersetzt wurde (s. Abb. 1). Dieser Versuch könnte darauf weisen, daß hier nur das fremde Anion (Br) kontrakturerzeugend wirkt. Es spricht aber dagegen, daß (zur Tyrodelösung gefügt) von Na Cl ähnliche (manchmal auch noch kleinere) Mengen als von Na Br eine Wirkung haben (erregende Augmentations- und hemmende

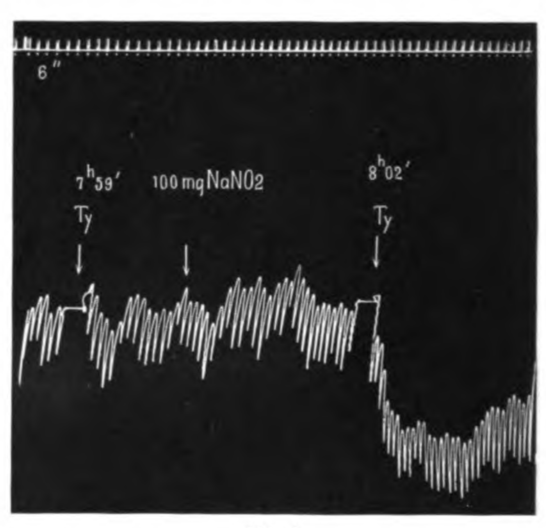


Abb. 4.
(14. Oktober 1924.) $NaNO_2$ zur Tyrodelösung gefügt. Keine Augmentationswirkung, deutliche Diminutionswirkung.

Diminutionswirkung), und hier ist wahrscheinlich die Konzentrationszunahme des Na-Ions die wirksame. Auch bei den anderen Salzen wirkt das Na-Ion der Anionen mit.

Wenn aber auch das Na-Ion eine Mitbedingung dieser Wirkungen ist, ist sie sicher nicht der einzige Faktor. Auch die fremde Säure bzw. das Anion muß einen Einfluß haben. Dies beweist der Umstand, daß die Wirkungen bei den verschiedenen Salzen untereinander deutliche quantitative Unterschiede aufweisen. So ist z. B. die Augmentations-, ebenso die Diminutionswirkung des Nitrats auch hier schwächer als die des Nitrits. Das Nitrit wirkte manchmal schon in fünfmal kleineren Gaben als das Nitrat und als die anderen Salze zu wirken pflegen (20 mg). Brachte aber das Nitrit (in anderen Fällen) keine Augmentationserregung zustande (oft auch nach 100 mg), so war jedoch die

Diminutionshemmung gewöhnlich vorhanden, oft auch stark ausgeprägt (s. Abb. 4).

Ähnlich diesen Salzen wirkte das NaSCN, welches, in ähnlichen Dosen der Tyrodelösung zugefügt, deutliche A-Erregung und D-Hemmung verursachte.

Einen genauen Vergleich der Wirkungsstärke bzw. Schwellenwertsgaben dieser Salze haben wir nicht unternommen, da wir uns mit der Feststellung des Vorhandenseins von Potentialwirkungen begnügten. Diese Aufgabe ist außerdem nicht ohne Schwierigkeiten, da die relative Empfindlichkeit der Därme gegenüber diesen Salzen etwas verschieden zu sein scheint.

Starke, auch maximale (vorübergehende) Kontrakturen verursachen aber die *calciumbindenden* Anionen. Von diesen untersuchten wir das Citrat, Oxalat, Fluorid, Phosphat (sekundär), Carbonat, Hydrocarbonat, welche wir in Form ihrer Na-Salze verabreicht haben. Zu diesen reihte sich noch das NaOH bzw. das Hydroxylion zu, welches im Sinne der Formel von *Rona* und *Takahashi* auch Ca-fällend wirkt. Schon ein plötzliches Steigen des p_H auf 8,2 bis 8,5 hat eine vorübergehende Kontraktur zur Folge.

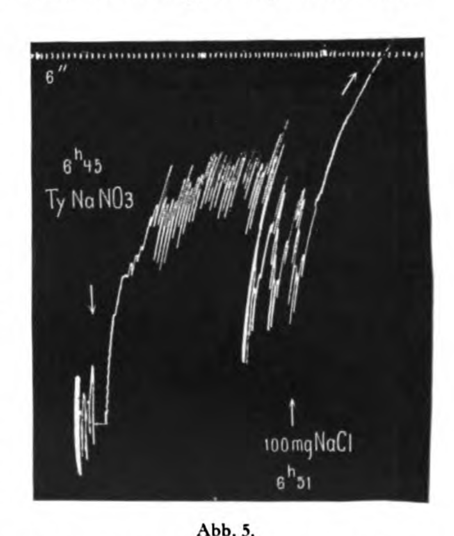


Abb. 5.
(25. September 1925.) Die Nitrat-Kontraktur wird durch Steigern der [NaCl] noch erhöht.

Von den Salzen wirkt am stärksten das Citrat und das Carbonat, von denen 10 bis 20 mg auf 75 ccm Tyrodelösung schon genügen, um eine eben deutliche Kontraktur zu erzeugen. Vom sekundären Phosphat sind diese Gaben 20 bis 30 mg, vom Oxalat und Fluorid 25 bis 50 mg, vom Bicarbonat 50 bis 100 mg.

Die Kontrakturhöhe hängt sehr davon ab, in welchem Tempo das calciumbindende Anion dem Darm zugeführt wird. Geschieht dies allmählich, in kleinen Dosen, so ist die Kontraktur minder hoch, oft bleibt sie auch ganz aus. Besonders hohe Kontrakturen erhält man, wenn man die normale Tyrodelösung mit der mit dem untersuchten Salze versetzten Lösung vertauscht. Dieses Verhalten war zu erwarten, da wir wissen, daß eine Abnahme der Calciumkonzentration der umspülenden Tyrodelösung am Darm eine vorübergehende Kontraktur

auslöst (1) (2). Verursachen Citrat und Oxalat eine Abnahme der Calciumionenkonzentration, so ist schon hierdurch eine erregende Wirkung zu erwarten. Geschieht dabei die Fällung (wie bekannt) bzw. die Ionenbindung nicht augenblicklich, sondern in meßbarer Zeit, so ist die schwächere Wirksamkeit beim allmählichen Zufügen hieraus schon verständlich.

So ergab sich nun die Frage, ob das Citrat- und Oxalation (bzw. die durch hydrolytische Spaltung vorhandenen Säuren) auch selbst eine Wirkung haben, oder aber eine solche nur durch Vermittlung über das Calcium zustande kommt. Dieser Frage versuchten wir auf zweierlei Wegen näher zu kommen.

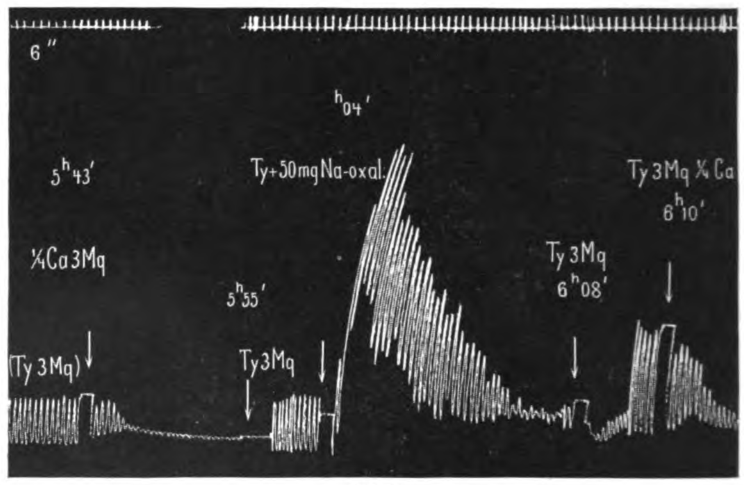


Abb. 6.

(1. Dezember 1924.) Natriumoxalat wirkt deutlich in Tyrodelösung mit dreifachem Mg-Gehalt (0,03 Proz. $MgCl_2$). Die Abnahme der [Ca] auf ein 1/4 Teil ist aber ohne Wirkung.

So untersuchten wir erstens die Wirkung in *Ca-freier Lösung*. Hier kann das Oxalat und Citrat keine Abnahme der [Ca] in der Umspülflüssigkeit zustande bringen, die Wirkung ist daher mit einer von Ca-armer Lösung sicher nicht identisch. Unsere Versuche zeigen, daß diese Salze auch unter solchen Umständen deutlich erregend wirken. Die Kontrakturhöhe ist auch hier kleiner als in normaler Tyrodelösung, aber die verschiedenartigsten Kontrakturerzeuger wirken unter solchen Umständen minder stark. Dieser Versuch beweist nur, daß die Wirkung nicht nur durch die umspülende Lösung zustande kommt. Es konnte aber ein Ausfallen des Calciums an der betreffenden Grenzfläche bzw. Zellenoberfläche den Effekt erzeugen. Die Wirksamkeit

bei Anwesenheit von Mg schließt aber auch diesen Wirkungsmechanismus aus.

Es wurde bereits beschrieben, daß die subnormale D-Wirkung des Ca durch Anwesenheit von Mg deutlich geschwächt wird, und in 0,03 Proz. (wasserfreier) $MgCl_2$ enthaltender Tyrodelösung gar nicht zustande zu kommen pflegt (1). Würde die Oxalat- und Citratwirkung nur auf einer Abnahme der Ca-Konzentration beruhen, so dürfte sie, wenn genügend Mg anwesend, nicht zustande kommen. Der Versuch zeigt aber, daß dies nicht der Fall ist, und an Därmen, wo in 0,03proz. $MgCl_2$-Lösung die D-Kontraktur von Ca vollständig ausbleibt, ergeben diese Salze deutliche (wenngleich auch schwächere) Wirkungen. Einen solchen Versuch zeigen Abb. 6 und 7. Dieser Umstand beweist also, daß die Wirkung höchstens nur *zum Teil* aus Ca-D-Wirkung besteht, und daß auch ein anderer Faktor im Spiele sein muß.

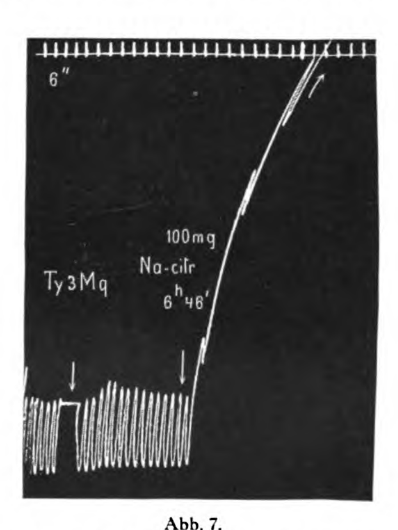


Abb. 7.
(1. Dezember 1924.) Fortsetzung des Versuchs der Abb. 6. — Na-Citrat wirkt auch stark in 0,03 Proz. $MgCl_2$-haltiger Tyrodelösung.

Diese Anionen müssen daher auch eine direkte Wirkung auf die Darmmuskulatur ausüben, und zwar Potentialwirkungen. Augmentation: Erregung, Diminution: Hemmung. Das Na-Ion kann auch hier eine Rolle spielen, jedoch ist ihr Einfluß von untergeordneter Bedeutung, da Citrat, Oxalat, und Fluorid auch in Konzentrationen wirken, in welchen ihr Na-Gehalt noch von keiner Bedeutung ist. (Äquivalente Kochsalzmengen haben keine Wirkung.) Die Wirkungen stammen daher von der Säure bzw. vom Anion.

Es sei hier noch zum Schluß *die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration* erwähnt. Nicht nur ein Steigern der Hydroxylionenkonzentration ist wirksam, sondern ein Absinken dieser unter den normalen Wert, d. h. ein Steigern der [H]. Fügt man der Tyrodelösung so viel Säure zu, daß sein p_H von 7,6 auf 6,9 fällt, so tritt schon ein deutliches vorübergehendes Sinken der Bewegungsamplituden auf. Bei weiterem Säurezusatz verschwinden die Bewegungen vollständig. War der Säureüberschuß nicht zu groß, so erscheinen die Bewegungen nach einigen Minuten wieder. Gibt man sodann dem Darm normale

Tyrodelösung, so erscheint eine ausgeprägte Diminutionskontraktur (s. Abb. 8).

Daß es sich hier um wahre Potentialwirkungen handelt und die Säure bei der Restitution nicht durch Alkalien, die aus dem Darm herausdiffundieren, neutralisiert wird, beweist schon das Vorhandensein der Diminutionskontraktur. Würde sich das p_H wieder auf den normalen Wert einstellen, so dürfte beim Wechsel auf frische Tyrodelösung keine Wirkung zustande kommen.

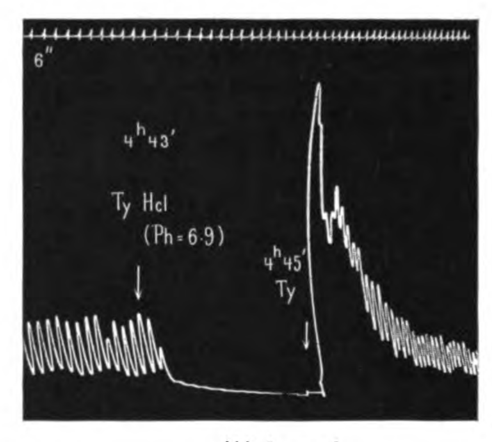


Abb. 8.
(17. September 1924.) — Wirkung der Senkung und Steigerung des p_H unter dem normalen Wert Ty + H Cl = mit H Cl versetzte Tyrodelösung. $p_H = 6{,}9$.

Wahrscheinlich hauptsächlich durch eine Steigerung der Wasserstoffzahl wirkt die *Tyrodelösung ohne Na-Bicarbonat*. Wird nach normalerTyrodelösung dem Darm eine solche verabreicht, so bewirkt sie einen starken, jedoch zum Teil vorübergehenden Tonusabfall und Lähmung der Spontanbewegungen. Diese erscheinen nach 2 bis 4 Minuten wieder, sind aber sehr unregelmäßig. Bei Rückkehr zur normalen Tyrodelösung erscheint eine ziemlich starke vorübergehende Kontraktur.

Das p_H der normalen Tyrodelösung ist 7,7, das der bicarbonatfreien 7,0. Hieraus geht hervor, daß durch das Sinken des p_H, die Wirkung der bicarbonatfreien Lösung schon verständlich ist und hierbei eine Diminutionswirkung des Bicarbonations nicht angenommen zu werden braucht.

Bemerkungen, Folgerungen.

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß auch Anionen auf die glatte Muskulatur eines Warmblüterorgans auffallende Wirkungen entfalten können und diese zum großen Teile als Potentialwirkungen anzusehen sind.

Beim Studium der Anionenwirkungen können bestimmte Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden. Eine solche ist die gleichzeitige Abnahme der Chlorionkonzentration (welche noch unbekannt ist), oder Zunahme der Natriumkonzentration bzw. Sinken der Calciumionenkonzentration. Die beiden letzteren müßten mit dem feststellbaren Effekt gleichsinnig wirken. Die erwähnten Versuche zeigen aber, daß den fremden Anionen bzw. Säuren am Darm überdies eigene Wirkungen zuzuschreiben sind.

Man könnte die Erklärung für diese Wirkungen auch darin suchen, daß die fremden Salze vielleicht besser permeabel sind und das NaCl osmotisch nicht vollwertig vertreten können. Die zustandekommenden Kontrakturen wären dann durch die relative Hypotonie der Außenlösung verursacht. Diese Erklärung wird aber widerlegt erstens durch die erwähnte Tatsache, daß das Zufügen von NaCl eine Anionenkontraktur noch verstärkt und zweitens dadurch, daß beim Zufügen der Salze zur normalen Tyrodelösung die Wirkungen durchaus ähnlich sind wie bei der Substitution.

Bisher wurden am Darm hauptsächlich nur die Wirkungen der „calciumbindenden" Säuren studiert, über Wirkungen der anderen Anionen finden wir in der Literatur keine Angaben.

Vom NaBr wurde behauptet [*Zondek* (3)], daß es das NaCl für die Froschherzen vollständig zu ersetzen vermag. Nach den Untersuchungen von *Burridge* (4) sollte dies jedoch nicht zutreffen, und nach längerer Umspülung wird die Kontraktionshöhe allmählich kleiner. Nach unseren Ergebnissen ist also der Säugerdarm gegenüber dem Br-Ion viel empfindlicher. Auch nach *Handovsky* (5) wirken Cl und Br am Froschherzen gleichsinnig. Rhodan und J vergrößern dagegen das Pulsvolumen, das Sulfat verkleinert dasselbe. In unseren Versuchen sind keine in qualitativer Hinsicht verschiedenartig wirkende Gruppen unterscheidbar, ähnlich den Resultaten von *Trendelenburg* (6), der diese Anionen an der Bronchialmuskulatur des Rindes alle tonussteigernd fand. Die Reihenfolge in der Wirkungsstärke war:

$$SCN > J > NO_3, Br, Cl.$$

Nach *Prochnow* (17) sind die fremden Anionen an der Carotis und Uterus ebenso tonussteigernd, und zwar nach der Reihe: $F > J > Br$.

Mehr ausgearbeitet ist die Pharmakologie des Citrats, Oxalats, Carbonats und Phosphats. Intravenös verabreicht, rufen $NaHCO_3$ (7) (8), Na-Citrat, Na-Oxalat, Na-Tartrat (9) am Darme kräftige Bewegungen hervor.

Salant und *Kleitman* (10) (11) sind der Ansicht, daß die darmerregende Wirkung dieser Salze nicht allein von der Calciumfällung herrührt, da die Wirksamkeit nicht von der Löslichkeit des Calciumsalzes abhängig ist. Dieser Beweis ist aber zur Unterstützung dieser Behauptung nicht vollwertig, da behauptet wird, daß durch Citrat usw. die Calciumionenkonzentration der Lösung (wahrscheinlich durch Bildung komplexer Ionen) stark herabgedrückt wird (12). Die Herzversuche von *Salant* und *Hecht* (13) sprechen zwar gegen eine solche Ionenabnahme. Auf ein Vorhandensein einer spezifischen Anionenwirkung von Na-Oxalat schließen auch *Fröhlich* und *Gussenbauer* auf Grund von Untersuchungen des Herzelektrokardiogrammes (14).

E. Starkenstein (15) beschrieb zuerst die erregende Wirkung calciumfällender Salze am isolierten Dünndarm. Da die Magnesiumsalze die Calciumfällung im gewissen Grade hemmen und das lösliche Mg-Oxalat und Mg-Metaphosphat am Darme wirkungslos sind, glaubt er damit die eigentliche Unwirksamkeit der Anionen bewiesen zu haben. Wir glauben aber, daß dieser Schluß nicht berechtigt ist, da das Mg-Ion am Darm stark hemmend wirkt und wahrscheinlich diese die Oxalat- und Phosphaterregung hemmt. Der Versuch beweist eben die spezifische Wirksamkeit dieser Anionen, da ohne diese die Wirkung des Magnesiums gelten sollte.

Die erregende Wirkung mancher anderen organischen Säuren, wie *Essigsäure, Brenztraubensäure* usw., ist auch oft von vorübergehender Natur, wie dies in einem früheren Aufsatz bereits erwähnt wurde (16). Es könnten also Potentialwirkungen auch bei diesen im Spiele sein.

Zusammenfassung.

Am isolierten Kaninchendünndarm wirken die Anionen Br, J, SO_4, NO_2, NO_3, SCN, F, Citrat, Oxalat, HCO_3, CO_3 und HPO_4 als Na-Salze in qualitativ gleicher Richtung, beim Zufügen bzw. bei Steigerung ihrer Konzentration vorübergehend erregend, bei der Abnahme ihrer Konzentration (vorübergehend) lähmend.

Verhältnismäßig am besten ist das NaCl durch $NaNO_3$ und $NaNO_2$ ersetzbar (manchmal auch völlig); bei 50proz. oder vollständiger Substitution des Kochsalzes der Tyrodelösung mit NaBr, NaJ und Na_2SO_4 verschwinden die Spontanbewegungen fast vollständig, vom Fluorid und calciumfällenden Salzen schon durch viel kleinere Gaben (manente Wirkungen).

Die Veränderung der Chlorionen- bzw. Natriumionenkonzentration kann die Wirkungen dieser Salze nicht erklären und es muß eine spezifische Anionenwirkung angenommen werden.

Auch eine Abnahme des Ca (durch Oxalat, Citrat usw.) erklärt die Wirkungen dieser Salze nicht vollständig, da diese auch in Lösung mit hohem Mg-Gehalt zustande kommen, wo die Wirkungen des Ca vermißt werden. Sie wirken auch in calciumfreier Lösung erregend.

Die Veränderungen des Bicarbonatgehalts bzw. der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung können am Darm auch Potentialwirkungen erzeugen.

Literatur.

1) *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **148**, 116, 1924. — 2) *L. Jendrassik* und *E. Annau*, ebendaselbst **163**, 207, 1925. — 3) *S. G. Zondek*, ebendaselbst **121**, 87, 1921. — 4) *W. Burridge*, Arch. int. de Pharm. **26**, 19, 1921. — 5) *H. Handovsky*, Pflügers Arch. **198**, 56, 1923. — 6) *P. Trendelenburg*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **69**, 79, 1912; *L. Prochnov*, Arch. int. Pharm. **21**, 287, 1911. — 7) *King* und *Ias*, Amer. Journ. of Physiol. **62**, 459, 1922. — 8) *Neukirch* und *Rona*, P. A. **148**, 273, 1912; *Enriquez* und Mitarbeiter, Bull. gen. Therap. **162**, 1914. — 9) *Salant* und *Kleitman*, Journ. of Pharm. **21**, 3, 1923. — 10) *Dieselben*, ebendaselbst **20**, 481, 1923. — 11) *Dieselben*, Amer. Journ. of Physiol. **65**. — 12) *J. R. Katz*, Akad. Wet. Amsterdam **32**, 568, 1923. — 13) *Salant* und *Hecht*, Proc. Soc. exper. Biol. **2**, 179, 1914. — 14) *Fröhlich* und *Gussenbauer*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **97**, 1923. — 15) *E. Starkenstein*, ebendaselbst **77**, 45, 1914. — 16) *L. Jendrassik* und *H. Tangl*, diese Zeitschr. **159**, 337, 1925. — 17) *L. Prochnon*, Arch. intern. Pharm. **21**, 287, 1911.

Beitrag zum Chemismus der Inaktivierung des Pepsins durch Wärme.

Von

Lilli Kraus.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Krankenanstalt „Rudolf-Stiftung“ in Wien.)

(Eingegangen am 24. Februar 1926.)

Gegenüber den zahlreichen Studien, die sich mit der chemischen Mechanik der Pepsinwirkung befassen, erscheint die chemische Natur des Erlöschens dieser Wirkung nach relativ geringer Erhitzung wenig studiert. Eine Erhitzung einer stark wirksamen Pepsinlösung auf wenige Grade über das Temperaturoptimum der Wirkung vernichtet die gesamte Wirksamkeit, und es erscheint dies um so auffälliger, als ja trockenes Pepsin ohne Schädigung seiner Wirkung auf 100° erwärmt werden kann. Bei der geringen Zahl chemischer Möglichkeiten, die bei dieser geringfügigen Erwärmung stattfinden können, lenkt dieser Gegensatz zwischen trockener und feuchter Erwärmung zunächst die Aufmerksamkeit darauf, ob nicht eine Wasseraufnahme oder eine Wasserabgabe stattfindet.

In erster Linie waren wir bestrebt, einige Eigenschaften des aktiven und inaktiven Pepsins zu studieren, über die noch relativ wenig berichtet wurde. Interessiert haben uns vor allem die Verhältnisse der Acidität, Veränderung der Säuremenge, Wasserstoffionenkonzentration, des nach *Sörensen* titrierbaren N, der Leitfähigkeit, der Refraktion sowie der Gefrierpunktserniedrigung.

Als Material haben wir, um nicht von der Darstellungsweise einseitig beeinflußte Resultate zu erhalten, einerseits amerikanisches Pepsin, andererseits ein Präparat verwendet, welches nach der Methode von *Hammarsten* dargestellt wurde. Bei der Darstellung des letzteren wurde genau nach der von obigem Autor angegebenen Methode gearbeitet (Zeitschr. f. phys. Chem. **108**, 1919). Die vom Pylorusteil getrennte Magenschleimhaut vom Schwein wurde zerhackt, 3 Tage

mit 0,2 proz. HCl in der Kälte stehengelassen, koliert und mehrmals durch ein Filter filtriert. Das Filtrat wurde durch Halbsättigung mit chemisch reinem NaCl gefällt, die rasch ausfallende Substanz nach einiger Zeit filtriert. Der zwischen Filtrierpapier ausgepreßte Niederschlag wurde in der Kälte in 0,2 proz. HCl gelöst, die Fällung mit NaCl wiederholt, der Niederschlag wie oben behandelt, abermals in 0,2 proz. HCl gelöst und mit NaCl ausgefällt. Dieser letzte Niederschlag wurde nach starkem Abpressen in 0,2 proz. HCl gelöst und gegen HCl von derselben Konzentration dialysiert. Bei einer zweiten Darstellung wurde ebenso verfahren, nur wurde die Dialyse nicht gegen 0,2 proz. HCl, sondern gegen destilliertes Wasser vorgenommen. Das Endprodukt der ersten Darstellung war eine kräftig wirkende Pepsinlösung, das der zweiten Darstellung eine gallertähnliche Masse. Diese letztere wurde abgepreßt und im Exsikkator getrocknet. Auf diese Weise erhielten wir als Maximalausbeute aus je 480 g Ausgangsmaterial 0,9 g trockene, gereinigte Substanz, welche wir im folgenden als „Hammarsten fest" bezeichnen, während wir obige HCl-Lösung als „Hammarsten Lösung" bezeichnen. Die Wirksamkeit des Präparats wurde durch Verdauungsversuche nach *Gross* (*J. Wohlgemuth*, Grundriß der Fermentmethoden, S. 135) untersucht. In der Verdauungsreihe zeigten die Lösungen in den Eprouvetten nach dem Ansatz mit Na-Acetat bis zur achten Eprouvette keine Trübung. Nach der Methode von *Mett* (*J. Wohlgemuth*, Grundriß der Fermentmethoden, S. 135) fanden wir für die Konzentration 1 : 20000 eine Verdauungskraft von 6 mm in 24 Stunden.

Die Inaktivierung des Materials wurde im Prinzip so durchgeführt, daß eine eingewogene Menge (bei Hammarsten Lösung ein bestimmtes Volumen) amerikanischen Pepsins bzw. „Hammarsten fest" in 150 ccm 0,2 proz. HCl gelöst wurde. Die eine Hälfte wurde in einem mit Glasstöpsel luftdicht verschließbaren Kolben 1 Stunde hindurch auf 68° C erwärmt und hierauf auf Zimmertemperatur abgekühlt. Durch einen Verdauungsversuch wurde ermittelt, daß die so behandelte Lösung ihre proteolytische Wirksamkeit völlig eingebüßt hatte. Die zweite Hälfte diente dann immer zum Vergleich. Die beiden festen Präparate, nämlich das amerikanische Pepsin, sowie „Hammarsten fest" wurden außerdem auch unter Einhaltung der oben angegebenen Bedingungen in neutraler, also HCl-freier Lösung inaktiviert.

Als erstes untersuchten wir sowohl im amerikanischen als auch in den beiden übrigen Präparaten die Säuremenge vor und nach der Inaktivierung und gleichzeitig die H-Ionenkonzentration nach der Methode von *Michaelis* (*L. Michaelis*, Deutsch. med. Wochenschr. 29. 4, 1921; *Michaelis* und *Fr. Müller*, ebendaselbst 8, 22). Die Lösungen wurden in der oben angegebenen Weise hergestellt, und wir fanden in der HCl-Lösung des amerikanischen Pepsins bei der Titration von

je 5 ccm im aktiven Präparat als Mittelwert 19,22 ccm n/100 KOH, im inaktiven 18,23 ccm n/100 KOH. Der p_H-Exponent im aktiven Pepsin betrug 1,03, im inaktiven 1,32. Beim Präparat „Hammarsten fest“ gingen wir auch wie oben vor und fanden bei der Titration als Mittelwert von fünf Bestimmungen im aktiven 19,31, im inaktiven 18,33 ccm n/100 KOH. Als p_H-Exponent ergab sich für das aktive 1,22. für das inaktive 1,53. Im Präparat „Hammarsten flüssig“ fanden wir als Mittelwert 17,06 gegen 16,04 ccm n/100 KOH im inaktiven; der p_H-Exponent betrug 1,02 gegen 1,37. Weitere Bestimmungen nahmen wir in HCl-freier Pepsinlösung vor, wobei wir feststellten, daß sowohl die aktive wie die inaktive Lösung des amerikanischen Pepsins und des Präparats „Hammarsten fest“ gegen Rosolsäure sauer reagierten. Wir fanden als Mittelwert von vier Bestimmungen im amerikanischen Pepsin beim aktiven Anteil 1,24, beim inaktiven 1,45 ccm n/100 KOH; der p_H-Exponent war im aktiven $1 \cdot 10^{-8}$, im inaktiven $1 \cdot 10^{-8,3}$. Beim Präparat „Hammarsten fest“ fanden wir bei der Titration 1,32 ccm n/100 KOH beim aktiven, gegen 1,57 ccm n/100 KOH im inaktiven. Der p_H-Wert war im aktiven $1 \cdot 10^{-8}$, im inaktiven $1 \cdot 10^{-8,2}$.

Um eine eventuelle Veränderung des Gehalts an endständigen NH_2-Gruppen festzustellen, bedienten wir uns der Methode von *Sörensen* (Enzymstudien, diese Zeitschr. 7, 45, 1908), doch verwendeten wir nicht n/5 Lösungen, da wir damit fast keine meßbaren Unterschiede erreicht hätten, sondern n/100 Lösung. Zu diesem Zwecke unterzogen wir alle unsere Präparate sowie auch das amerikanische Pepsin dieser Untersuchung. Es wurde wieder eine Lösung mit einem HCl-Gehalt von 0,2 Proz. hergestellt, von der ein Teil inaktiviert wurde. Wir titrierten stets je 5 ccm der aktiven sowie der inaktiven Lösung und fanden beim amerikanischen Pepsin als Mittelwert von fünf Bestimmungen im aktiven Anteil 19,54 ccm n/100 KOH, im inaktiven 18,57 ccm n/100 KOH, woraus sich eine Differenz von 0,97 ccm ergab. Beim Präparat „Hammarsten fest“ fanden wir im aktiven Pepsin als Mittelwert von fünf Bestimmungen 19,85 ccm, im inaktiven 18,99 ccm, also eine Differenz von 0,86 ccm n/100 KOH. Im Präparat „Hammarsten flüssig“ ergaben wieder fünf Bestimmungen im aktiven Teile einen Mittelwert von 17,06 ccm, im inaktiven 16,04 ccm, demnach eine Differenz von 1,02 ccm n/100 KOH. Wir untersuchten vom amerikanischen Pepsin und vom Präparat „Hammarsten fest“ auch säurefreie Proben und fanden als Mittelwert von je vier Bestimmungen im amerikanischen aktiven Pepsin 1,78 ccm, im inaktiven 1,96, aber eine Differenz von 0,18 ccm n/100 KOH. Im Präparat „Hammarsten fest“ ergab sich als Mittelwert von vier Bestimmungen beim aktiven 1,84 ccm, beim inaktiven 2,02 ccm, aber wieder eine Differenz von 0,20 ccm n/100 KOH.

Anschließend daran führten wir in derselben Reihenfolge wie bisher die Bestimmungen der Leitfähigkeit aus und fanden durchweg eine Abnahme derselben in den inaktiven Präparaten, sowohl in HCl als auch in neutraler Lösung.

Wir haben auch die Refraktometerwerte einer Untersuchung unterzogen und fanden, daß die bei der Bestimmung derselben sich ergebenden Wertdifferenzen wohl innerhalb der Fehlergrenzen liegen.

Die gleichen Schlußfolgerungen haben sich auch aus den nachfolgenden Bestimmungen ergeben.

Die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung ergab durchweg für das aktive Präparat höhere Werte als für das inaktive. Wir geben hier für die gefundenen Werte die tabellarische Übersicht:

	Wasser gelöst		HCl 0.2 Proz. gelöst	
	aktiv	inaktiv	aktiv	inaktiv
1.	+ 0,045°	+ 0,038°	— 0,124°	— 0,204°
	+ 0,040	+ 0,032	— 0,122	— 0,202
	+ 0,045	+ 0,036	— 0,124	— 0,202
	H_2O : + 0,126°		H_2O : + 0,124°	
2.	+ 0,040°	+ 0,030°	— 0,120°	— 0,202°
	+ 0,038	+ 0,030	— 0,118	— 0,200
	+ 0,040	+ 0,032	— 0,120	— 0,200
	H_2O : + 0,122°		H_2O : + 0,124°	

	aktiv	inaktiv
3.	— 0,114°	— 0,202°
	— 0,100	— 0,200
	— 0,100	— 0,200
	H_2O : + 0,126°	

Die Differenzen in der Oberflächenspannung der aktiven und inaktiven Präparate ermittelten wir durch Tropfenbestimmung (*Ostwald-Luther* 262) und fanden:

	Aktiv	Inaktiv	Aktiv	Inaktiv	Aktiv	Inaktiv
1.	55	59	57	67	56	61
	55,75	59,5	57	66	55	61
	55,5	59	56,5	67	56	61
2.	58	63	63,5	69,5	54,5	59
	57	63	63,5	69	54	60
	57	63	64	69	54	59
3.	56	61	58	62	57	61
	56,5	61	58	62,5	57,75	61,5
	56	61	56	62	57,5	61

Die Bestimmung des Trockengewichts der aktiven sowie der inaktiven Substanz ergab:

1. Amerikanisches Pepsin.

Aktiv	Inaktiv	Differenz
0,1920	0,2132	0,0212
0,1501	0,1652	0,0150

2. Hammarsten fest.

Aktiv	Inaktiv	Differenz
0,1376	0,1515	0,0139
0,1463	0,1604	0,0141

3. Hammarsten Lösung.

Aktiv	Inaktiv	Differenz
0,2368	0,2624	0,0256
0,1202	0,1332	0,0130

Die angeführten Untersuchungsmethoden ließen keine unmittelbaren Schlüsse bezüglich der möglichen Wasseraufnahme bzw. der Wasserabspaltung zu. Um diese Frage eindeutiger zu entscheiden, bedienten wir uns ferner folgender Untersuchungsmethoden:

Wir bestimmten die elementare Zusammensetzung des aktiven und inaktiven Pepsins und fanden:

1. Amerikanisches Pepsin.

C = 38,23 Proz., H = 7,08 Proz., inaktiv: C = 38,10 Proz., H = 7,18 Proz.

2. Hammarsten fest.

C = 39,64 Proz., H = 8,04 Proz., inaktiv: C = 39,51 Proz., H = 8,17 Proz.

3. Hammarsten Lösung.

C = 39,67 Proz., H = 8,11 Proz., inaktiv: C = 39,10 Proz., H = 8,47 Proz.

Die Ergebnisse der Trockengewichstbestimmung zeigen eine Zunahme des Gewichts in der inaktiven Substanz. Die Ergebnisse der Mikroverbrennung ergaben, daß der Gehalt an H, bezogen auf die Gesamtmenge der Substanz im inaktiven Pepsin höher, der Gehalt an C niedriger ist als im aktiven Pepsin. Wenn diese Zunahme des H der Abnahme des C nicht vollständig entspricht, so mag in dieser Beziehung, da ja eine Reihe von anderen Analysen dieselben Resultate ergeben

haben und somit an der Richtigkeit derselben nicht zu zweifeln ist, zu erwägen sein, daß bei der unvermeidlichen Anwesenheit anorganischer Bestandteile sich beim Inaktivierungsvorgang Veränderungen vollziehen, welche bewirken, daß bei der Veraschung eine Differenz zugunsten des C des inaktivierten Präparats entsteht.

Zur weiteren Festigung dieses Ergebnisses, das an einen Eintritt von Elementen des Wassers denken ließ, haben wir versucht, den Hydroxylgehalt auf dem Wege der Benzoylierung zu bestimmen.

Im folgenden führen wir die Resultate der Benzoylierung an und schicken die Beschreibung der Methode der Benzoylierung voraus. Wir bedienten uns im allgemeinen der von *Blum* und *Umbach* (Zeitschr. f. phys. Chem. 88, Zur Benzoylierung von Eiweißkörpern) gegebenen Na-Hydrocarbonatmethode und gingen dabei folgendermaßen vor: Die Pepsinlösung wurde mit Na-Hydrocarbonat, hierauf mit Benzoylchlorid in einem gegebenen Verhältnis versetzt, welches eine beständige alkalische Reaktion des Gemisches gewährleistete hierauf wurde 3 Stunden geschüttelt, absetzen gelassen, dekantiert, der weiße körnige Rückstand mit Wasser aufgeschlemmt und durch Dekantieren von der großen Menge der wasserlöslichen Beimengungen getrennt. Dieses Waschen wurde fortgesetzt, bis in der Waschflüssigkeit weder mit $AgNO_3$, noch mit $BaCl_2$ eine Reaktion eintrat, dann wurde mit Essigsäure, hierauf mit verdünnter Schwefelsäure, mit einer Lösung von $NaHCO_3$ und endlich wieder mit CH_3COOH gewaschen und mit Lignin extrahiert (*Meyer*, Analyse und Konstitutionsvermittlung organischer Verbindungen, S. 521). Die eingetretene Benzoylmenge wurde durch Verseifen des erhaltenen Produkts mit alkoholischer KOH abgespalten, hierauf wurde H_3PO_4 zugesetzt und die freie $C_6H_5 . COOH$ durch Wasserdampfdestillation isoliert und titrimetrisch gegen Rosolsäure bestimmt.

Amerikanisches Pepsin: $E = 0{,}1975$ g, gelöst in 100 ccm, versetzt mit 5 g $NaHCO_3$ und allmählich etwa 2 g Benzoylchlorid unter fortwährendem Schütteln eingetragen. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben angeführt; nach der Extraktion mit Ligroin fanden wir 0,217 14 g Substanz. Die im Wasserdampfdestillat befindliche Menge Benzoesäure entsprach 3,51 ccm n/10 KOH, das ist 0,035 46 g Benzoyl; bezogen auf die durch Ligroin extrahierte Menge Substanz also 16,33 Proz.; im inaktiven amerikanischen Pepsin: $E = 0{,}2008$ g fanden wir die durch Ligroin extrahierte Substanz zu 0,239 57 g, bei der Titration des Wasserdampfdestillats verbrauchten wir 5,43 ccm n/10 KOH, woraus sich das eintretende Benzoyl mit 0,054 84 g errechnete, das ist in Prozenten der verseiften Substanz 22,89 Proz. Die Untersuchungen der Benzoylprodukte des aktiven und inaktiven Präparats „Hammarsten fest“ ergaben für das aktive 17,29 Proz., für das in-

aktive 24,59 Proz. eingetretenes Benzoyl. Beim Präparat „Hammarsten Lösung“ fanden wir für das aktive 16,89 Proz., für das inaktive 23,03 Proz. *In allen Fällen fanden wir also eine Zunahme der benzoylierbaren Gruppen in der inaktiven Substanz.*

So konnten wir also als endgültiges Ergebnis unserer Untersuchungen einerseits eine Zunahme des Trockengewichts, andererseits bei der Elementaranalyse eine Zunahme des H, endlich bei der Benzoylierung eine Vermehrung der OH-Gruppen feststellen, wodurch die Annahme einer Wasseraufnahme gerechtfertigt erscheint.

Zur Kenntnis der Katalase und ihrer Beziehung zu biologischen Oxydationen.

Zweite Mitteilung über Leberkatalase[1]).

Von

Samuel Hennichs.

(Aus dem biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 2. März 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Obwohl ein reichhaltiges Versuchsmaterial gezeigt hat[2]), daß der Katalasegehalt eines Organs nicht als Maß der Stoffwechselintensität des betreffenden Organs angesehen werden darf, und wenn auch die Veränderungen, die der Katalasegehalt unter wechselnden physiologischen Bedingungen erfährt, z. B. mit dem Sauerstoffverbrauch, nicht parallel gehen, und wenn man ferner dem Enzym irgendeine oxydative Aufgabe nicht zuschreiben kann, so unterliegt es doch keinem Zweifel, daß das Enzym Katalase in genetischem Zusammenhang mit den Oxydationsprozessen im Körper steht.

Sergius Morgulis wie auch *Thunberg*[3]) und *Ahlgren*[4]) schließen sich der *Wieland*schen[5]) Oxydationstheorie an, nach welcher alle Oxydationen durch Wasserstoffabsonderungen von den vorhandenen Stoffen zustande kommen. Dieser Wasserstoff wird nachher durch einen geeigneten Akzeptor oxydiert. Es liegen zahlreiche Beispiele dafür vor, daß im Falle der Akzeptor aus molekularem Sauerstoff besteht, das Wasserstoffperoxyd als Nebenprodukt bei der Reaktion außerhalb des Organismus auftritt. Dieses soll nach *Wieland* auch bei Oxydationsprozessen im Körper der Fall sein, und die Aufgabe der Katalase wäre deshalb, eine Anhäufung dieses Stoffes in Mengen, die für das Organ schädlich sind, zu verhindern. Hierdurch könnten ja auch die Oxydationsreaktionen beschleunigt werden.

Diese Theorie stammt von *Loew*, während *Wieland* durch seine Dehydrierungsversuche ein anschauliches Bild von der Entstehungsweise des Wasserstoffperoxyds gegeben hat. Betreffs des Schädlichkeitsgrades von H_2O_2 für das lebende, organische Gewebe waren die Meinungen sehr geteilt.

---

[1]) Erste Mitteilung siehe diese Zeitschr. **145**, 286, 1924.

[2]) *Sergius Morgulis*, Physiologische Bedeutung der Katalase. Ergebn. d. Physiol. **23**, 357, 1924.

[3]) *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **35**, 163, 1917/18.

[4]) *G. Ahlgren*, ebendaselbst **47**, suppl., 1925.

[5]) *Wieland*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 484; **46**, 3327; **47**, 2085; **54**, 2353; **55**, 3639; Liebigs Ann. **431**, 301; **434**, 185; **436**, 229, **439**, 196; **445**, 181; Ergebn. d. Physiol. **20**, 477, 1922.

Otto Warburg hat in den letzten Jahren durch eine Serie von Abhandlungen hauptsächlich in dieser Zeitschrift[1]) eine andere Theorie über die biochemische Oxydation vertreten, die das Eisen im Verein mit organischer Substanz zum Katalysator für die Oxydationsprozesse macht. Hierbei stützt sich *Warburg* auf eine große Reihe von Untersuchungen.

Es war bereits geglückt, molekularen Sauerstoff außerhalb des Organismus zu aktivieren und damit Stoffe zu oxydieren, die nicht autooxydabel sind. *Freundlich* und *Masius* oxydierten, mit dem Sauerstoff der Luft und Kohle als Aktivator, Oxalsäure zu Kohlensäure. Dasselbe Resultat erhielten *Freundlich* und *Bjercke* mit Phenylthioharnstoff.

Warburg selbst hat zum Teil mit Mitarbeitern die Oxydation des Eiweißstoffes Cystin mit Sauerstoff und *Mercks* „Tierblutkohle" als Katalysator besonders eingehend studiert. Die Produkte bei dieser Reaktion erwiesen sich als dieselben wie bei der entsprechenden Reaktion in lebendem, organischem Gewebe, nämlich: Kohlensäure, Wasser, Ammoniak und Schwefelsäure. Ähnliche Versuche mit Tyrosin und Leucin fielen positiv aus, mit Zucker, Fettsäuren, Milchsäure und Äpfelsäure dagegen negativ.

Die reagierenden Stoffe wurden bei diesen Reaktionen durch Adsorption an Kohle aktiviert, was durch Vergiftungsversuche bewiesen wurde; von ausschlaggebender Bedeutung für die Oxydationsaktivität einer Kohlenart erwies sich jedoch deren Eisengehalt, obschon irgendeine Proportionalität zwischen diesen Größen kaum zu spüren ist.

Warburg nimmt an, daß die schweren Metalle, besonders Eisen, nach gewissen Zentren in der Kohle orientiert sind, wo auch die Oxydation vor sich geht. Dies kann die Erklärung dafür sein, daß HCN eine Giftwirkung hat, die tausendmal größer ist als die, welche nur durch Adsorptionsverdrängung bewirkt wird.

Warburg erblickt in diesen vorher referierten Versuchen Beispiele dafür, wie sich die Oxydation im Körper vollzieht. Im Hinblick auf die Tatsache, daß Eisen für das Leben der Zelle notwendig ist, zeigt er experimentell, daß Eisen in lebenden Zellen und in Blutkohle einen Sauerstoffverbrauch in gleicher Größenordnung pro Gewicht und Zeiteinheit bewirkt. In völliger Analogie erhöht sich die Atmung der Zellen durch Zusatz von Eisen, und HCN ist ein spezifisches Gift für dieselbe. Das Eisen muß sich jedoch in organischer Verbindung befinden.

Warburg behauptet sogar, daß sich sämtliche Reaktionen, die in besonders hohem Grade durch HCN vergiftet werden, auch durch Eisenverbindungen katalysieren lassen. Er meint, daß die Verbrennung im Körper an der Grenzschicht zwischen dem flüssigen Zellinhalt und den festen Strukturteilen stattfindet. Die Aktivierung geschieht somit auch hier durch Adsorption.

Betreffs der Oxydation der Kohlehydrate findet *Warburg* Fructose als autoxydabel in Phosphatlösung mit vorhandenen Eisenspuren.

Für die Oxydation des Fettes erwies sich Eisen nach *Warburg* besonders aktiv, da dasselbe mit einer Sulfhydrylgruppe verbunden ist.

Warburg[2]) wird deshalb, solange wir Atmung und Oxydationserscheinung im Körper als identisch mit einander betrachten, im Atmungsenzym „die

[1]) *Warburg*, Festschrift Kaiser Wilhelm-Ges. 224, 1921; diese Zeitschr. **118**, 257, 1921; **119**, 134, 1921; Pflügers Arch. **200**, 203, 1923; diese Zeitschr. **136**, 266, 1923; **152**, 51, 191, 479, 1924; **146**, **380**, 1924; **142**, 317 und 518, 1923; *S. Sakuma*, ebendaselbst 142, 68, 1923. *Minami*, ebendaselbst **142**, 334, 1923; *Negelein*, ebendaselbst **142**, 493, 1923.

[2]) Diese Zeitschr. **152**, 494, 1924.

Summe aller katalytisch wirksamen Eisenverbindungen „erblicken", die in der Zelle vorkommen. Rechnen wir der Atmung Vorgänge hinzu, in denen, wie in der Reaktion zwischen Fructose und Phosphat, besondere Affinitäten zum Eisen erst entstehen, so ist auch die Phosphorsäure ein Bestandteil des Atmungsferments und mit ihr alle Stoffe, die durch Spaltungen oder Kondensationen Bindungsmöglichkeiten für das Eisen schaffen. Ob wir nun den Begriff der Atmung eng oder weit fassen, immer wird das Eisen als der sauerstoffübertragende Bestandteil des Atmungsferments seine zentrale Stellung behalten, denn die Oxydation ist derjenige Vorgang, durch den sich die Atmung von anderen Fermentreaktionen unterscheidet und in der sich der Sinn der Atmung, die Gewinnung von Energie, erfüllt."

Obschon das Verbrennungsproblem durch diese *Warburg*schen Versuche von einer neuen Seite beleuchtet wurde, dürfte es doch fraglich sein, in denselben Beispiele für die Atmung im Organismus zu erblicken.

Erstens hat die Verbrennung von Eiweißstoffen eine untergeordnete Bedeutung im Verhältnis zu der Verbrennung von Fett und Kohlehydraten. Zweitens werden die vorhandenen Stoffe sicher nicht mit ihren ungespaltenen Molekülen verbrannt, sondern dieselben erleiden zunächst eine Reihe von Verwandlungen und Spaltungen, ehe sie endlich ausoxydiert werden.

Da *Warburg* gegen *Wieland* anführt, daß letzterer einseitig mit der Aktivierung des Wasserstoffs rechnet, könnte man dasselbe gegen ihn anführen, obwohl es sich hier um die Aktivierung des Sauerstoffs handelt[1]. Die Frage, welcher von beiden Stoffen aktiviert werden kann, wird sich experimentell schwer entscheiden lassen.

Für *Warburgs* Theorie spricht unzweifelhaft der Umstand, daß die Oxydation von Bernsteinsäure mit molekularem Sauerstoff durch Blausäure vergiftet wird, jedoch nicht die entsprechende Oxydation mit Methylenblau. Die *Warburg*sche Theorie fordert andererseits, daß ein oxydativer Stoffwechsel, der durch eine Eisenverbindung katalysiert wird, durch eine Blausäuremenge, die im Verhältnis zur Eisenmenge steht, vergiftet wird. Hiergegen liegen jedoch negative Beweise vor. So findet z. B. *Robinson*[2]), daß bei der Oxydation von Leinöl mit Hämoglobin, Methämoglobin und Hämin die der Eisenmenge äquivalente Menge Blausäure nicht vergiftend wirkt. Ferner finden *Dixon* und *Thurlow*[3]), daß die Oxydation von Xanthin keine Eisenkatalyse ist und nicht von m/100 HCN beeinflußt wird.

Sergius Morgulis sucht dann einen Mittelweg zwischen diesen beiden Theorien, wenn auch *Warburg* eine solche Möglichkeit bezweifelt. Er schlägt deshalb folgenden Kompromiß vor: „Fe" ist „der notwendige Katalysator für die biologische Oxydation, wo der Sauerstoff wie der H-Akzeptor wirkt und Wasserstoffsuperoxyd bildet".

Das Ziel der vorliegenden, auf Veranlassung von Herrn Professor *von Euler* angestellten Untersuchung war, an derjenigen Komponente

---

[1]) Die Aktivierung der Aminosäuren wird wohl bei der Adsorption zur Kohle von der dadurch bewirkten Konzentrationserhöhung hervorgerufen.

[2]) *Robinson*, Biochem. Journ. 18, 255, 1924.

[3]) *Dixon* und *Thurlow*, ebendaselbst 19, 672, 1925.

des Oxydo-Reduktionssystems der Zellen, welche durch die katalytische Wirkung auf Hydroperoxyd gekennzeichnet ist, also an der sogenannten *Katalase, Zusammenhänge zwischen Wirksamkeit und Eisengehalt aufzusuchen.*

Die notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Bearbeitung des angedeuteten Problems ist natürlich eine möglichst weitgehende Befreiung der katalasehaltigen Extrakte von inaktiven Verunreinigungen, und deswegen mußten meine früheren *Reinigungsarbeiten* fortgesetzt und die Methoden ergänzt werden. Im folgenden Kapitel sind meine diesbezüglichen Ergebnisse zusammengestellt.

Die hochaktiven Katalasepräparate, die als Erstresultate dieser Arbeit erhalten wurden, sind in erster Hand natürlich auf ihren Eisengehalt untersucht worden. Nachdem auf dieser Basis die Frage des Eisens als einziger aktiver Gruppe des Enzyms etwas besprochen worden ist, soll in Kapitel IV *die Inaktivierung der Katalase durch Blausäure* behandelt werden. *Warburg* kommt zu dem Schluß, „daß die Wirkung der Blausäure auf die lebendige Substanz in nichts anderem besteht als in der Bindung katalytisch wirksamen Eisens zu einer katalytisch unwirksamen Eisen-Blausäureverbindung“.

Wie ich einleitend hervorheben will, fälle ich auf Grund meiner Versuche keine Entscheidung darüber, ob und in welchem Grade die *Warburg*schen Schlüsse über die Atmung als Eisenkatalyse und als Oberflächenverbrennung allgemein zutreffen, ich glaube aber wohl, daß meine Untersuchungen zur Präzisierung der Fragestellung auf diesem vielbesprochenen Gebiet der Biochemie beitragen können.

Zum Schluß habe ich nach Orientierung über die Verhältnisse bei der Oxydation von Aminosäuren durch organische Kohle die beiden Theorien für den Oxydationsmechanismus teilweise auf Grund meiner eigenen Ergebnisse besprochen.

II. Reindarstellung des Enzyms mit Leber als Ausgangsmaterial.

1. Frühere Untersuchungen.

Außer *Madinaveitia,* auf welchen ich in meiner oben genannten Abhandlung[1]) Bezug nahm, ist mir kein Forscher bekannt, der sich der modernen, von *Willstätter* in die Enzymchemie eingeführten und allgemein anerkannten Adsorptionsmethoden für die Reindarstellung des Enzyms Katalase bedient hätte.

Tsuchihashi[2]) wandte mit einigem Erfolg eine Methode an, die in fraktionierter Chloroformfällung und darauf folgender Adsorption mit Calciumphosphat und Elution bestand.

---

[1]) *S. Hennichs,* Studien über Leberkatalase. Diese Zeitschr. **145,** 286, 1924.

[2]) *Tsuchihashi,* diese Zeitschr. **140,** 63, 1923.

Morgulis[1]) teilt in seiner oben zitierten Zusammenstellung eine Reihe von Versuchen über die Reindarstellung des fraglichen Enzymes mit, die er zusammen mit *Leggett* vorgenommen hat:

Bei der Adsorption mit Zinkphosphat und *Lloyds* Alkaloidreagens erwies sich die Elution mit großen Schwierigkeiten verbunden. Mit Leber als Ausgangsmaterial führte eine dreimalige Fällung mit Aceton zu hochaktiven Präparaten, die nach mehreren Richtungen hin untersucht wurden.

Da es in meiner früheren Untersuchung darauf ankam, die Möglichkeiten für eine erfolgreiche Reindarstellung des oben beschriebenen Enzyms mit Hilfe der genannten Methoden einwandfrei zu prüfen, erwies sich die Anwendung von *Battellis* und *Sterns* Methode für die Darstellung des Enzympräparats als vorteilhaft. Von diesem konnten nach und nach neue Enzymlösungen mit verhältnismäßiger Übereinstimmung an Gehalt und Aktivität erhalten werden. Hierbei ist zu bemerken, daß Toluol erst nach dem Schütteln zugesetzt werden sollte, da dasselbe die Auflösung des Enzyms zu verhindern scheint. *Wieland* hat in seiner letzten Abhandlung sehr erfolgreich mit *Battellis* und *Sterns* Methode gearbeitet. Irgendwelche detaillierten Mitteilungen macht er nicht. Die Ausbeute scheint auch gering zu sein. Von dem letztgenannten Verfahren mußte natürlich Abstand genommen werden, da der Zweck der vorliegenden Aufgabe in der Darstellung von hochaktiven Präparaten in solchen Mengen lag, die eine nähere Charakterisierung gestatten. Man kann hierbei in Frage stellen, ob sich Pferdeleber, eine so eisenhaltige Substanz, als Ausgangsmaterial eignet, da man bei den Endprodukten einen möglichst geringen Eisengehalt wünscht. Dieses Material übertrifft jedoch bezüglich der Aktivität alle anderen Stoffe, z. B. vegetabilische Substanzen, so bedeutend, daß seine Anwendung gerechtfertigt ist.

Zur Bestimmung der Aktivitäten wurde dieselbe Versuchsmethodik[2]) wie vorher angewandt, da sie als vollständig zuverlässig angesehen werden kann. Als Substrat diente „*Mercks* Perhydrol zur Analyse" in Lösungen, schwankend zwischen 0,015 bis 0,010 n. Aus der nachstehenden Tabelle geht hervor, daß die Reaktionskonstante von der Substratkonzentration weit über die Grenzen unabhängig ist, innerhalb welcher man sich in der vorliegenden Untersuchung bewegte.

---

[1]) *Morgulis* und *Leggett*, Erg. d. Physiol. 23, 319 und 324, 1924.

[2]) Diese Zeitschr. 145, 286, 1924. In meiner ersten Abhandlung wurden die Kat.f.-Werte auf das Trockengewicht der Reaktionslösung pro 1000 ccm bezogen. Analog den entsprechenden Ausdrücken für die Wirksamkeit anderer Enzyme beziehe ich hier das Trockengewicht auf die angewandte Reaktionsmischung von 50 ccm. Dadurch werden die Werte für Kat.f. 20mal größer als die früher angegebenen.

Tabelle I.

Versuch über die Wirkung der Substratkonzentration auf die Reaktionskonstante. Mit einem Enzympräparat von Kat.f. = 8500,0 wurden folgende Reaktionskonstanten in H_2O_2 wechselnder Konzentration gewonnen. Temperatur 0°.

(H_2O_2)-Konzentration	Reaktionskonstante	(H_2O_2)-Konzentration	Reaktionskonstante
0,016 023	0,0102	0,006 867	0,0100
0,011 445	0,0100	0,004 578	0,0101

2. *Eigene Aktivität und Eisengehalt der Leber.*

Das Ausgangsmaterial für meine Reindarstellungsarbeiten war Leber vom Pferde. Diese Tierart weist nach *Battellis* und *Sterns* Zusammenstellung[1]) die katalasereichste Leber auf. Unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere wurden die weichen Teile der Leber in noch warmem Zustande bearbeitet.

Nach Entfernung der Bindegewebshaut sowie der zäheren Teile im Inneren wurde die Leber in Würfel zerschnitten und dreimal durch eine Fleischhackmaschine getrieben, wodurch man eine homogene, dunkelbraune, dickliche Masse erhielt, die dann weiter extrahiert wurde.

Aus den folgenden Tabellen geht hervor, wie die eigene Aktivität der Leber sich um Kat.f. = 20[2]) bewegt. Der Wert ist natürlich schwer zu bestimmen, teils weil die Aktivität so groß ist, daß man in um so kleineren Mengen abwiegen muß, und teils deswegen, weil die Leberpartikelchen und eine H_2O_2-Lösung ein heterogenes System darstellen, bei dem die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Grade von der Diffusion abhängig ist. Ich habe mich deshalb in diesem Punkte auf einige wenige Bestimmungen beschränkt, nur um zu zeigen, wie hochaktiv meine Endpräparate im Verhältnis zum Ausgangsmaterial sind.

Für Ochsen und Kühe fanden *Krüger* und *Meyer*[3]) einen Eisengehalt der Lebertrockensubstanz von 0,246 bis 0,276 Prom. Für Pferdeleber scheinen keine Angaben vorzuliegen.

Ein nach *Battellis* und *Sterns* Methode dargestelltes Leberpulver ergab folgende Zahlen: Aschengehalt 2,30 Proz., davon Eisengehalt 0,27 Proz.

---

[1]) *Battelli* und *Stern*, Ergebn. d. Physiol. 10, 573, 1910.

[2]) Die Aktivität ist hier auf die rohe Lebersubstanz berechnet, da dieses die späteren Berechnungen vereinfacht. Da das Trockengewicht der Leber sich um 30 Proz. herum bewegt, ist dessen Aktivität, auf die Trockensubstanz gerechnet, etwa 60.

[3]) Zeitschr. f. Biol. 27.

Eine aus diesem Präparat hergestellte Enzymlösung ließ ich bis zur Trockenheit eindunsten. Die Aktivität war Kat.f. = 906,4 und dessen Aschengehalt 10,01 Proz., davon Eisen 2,37 Proz.

Nach einer Serie paralleler Kaolinadsorptionen mit Enzymlösungen aus dem fraglichen Präparat wurden sämtliche Enddialysen zu einem gemeinsamen Präparat eingedunstet mit der Aktivität Kat.f. = 1011,7 und einem Aschengehalt 12,76 Proz., davon Eisen 3,67 Proz.

Sowohl das von mir zur Anwendung vorgesehene Kaolin wie die übrigen eventuell vorkommenden Chemikalien wurden vor Beginn der Untersuchungen mit negativem Resultat auf Eisen geprüft. Ich bediente mich hierbei *Friedenthals* und *Lachs'*[1]) kolorimetrischer Methode. Dieselbe wandte auch *Willstätter*[2]) bei seinen Oxydaseuntersuchungen und *Warburg*[3]) bei seinen oben referierten Versuchen an. Diese Methode ist bei Versuchen, in denen es sich um so kleine Mengen wie hier handelt, die einzig anwendbare.

Es scheint also, als ob sowohl der Eisengehalt als auch der Aschengehalt die Neigung haben, bei dem vorliegenden Reinigungsverfahren zu steigen.

3a. Extraktionsversuche mit Wasser.

Die feingemahlene Leber wurde in Übereinstimmung mit *Battelli* und *Sterns* Methode sehr sorgfältig mit ihrem entsprechenden Volumen Wasser vermengt, worauf die Mischung 1 Stunde bei mehrfacher Umrührung stehen blieb. Hierbei veränderte sich die Farbe in Grau.

Es war von Interesse zu sehen, wie effektiv diese ziemlich einfache Methode sein kann, und es zeigte sich, daß sich nach Kolierung durch ein ziemlich feines Tuch, über ein gewöhnliches Sieb gespannt, zwischen 20 und 30 Proz. des Trockengewichts der Leber in den so erhaltenen „Filtraten" befand. Die gesamte Aktivität derselben (also das Produkt von Aktivität und Trockensubstanz) übertrifft dagegen sogar die eigene totale Aktivität der Leber um das Mehrfache.

Dieses letztgenannte Phänomen kann zum Teil darauf beruhen, daß die auf oben beschriebene Weise erhaltenen Werte betreffs der eigenen Aktivität der Leber etwas zu niedrig ausfielen. Die hier unten angeführten Versuche sollen jedoch veranschaulichen, daß die Annahme des Vorhandenseins eines Hemmungskörpers motiviert ist.

---

[1]) *Friedenthal* und *Lachs*, diese Zeitschr. **32**, 130, 1911.
[2]) *Willstätter*, Ber. d. d. Chem. Ges. **53**, 1152, 1920.
[3]) *Warburg*, diese Zeitschr. **119**, 162, 1921.

Tabelle II.

Quantitative Verhältnisse bei zwei Extraktionsversuchen.

Versuch Nr.	Anzahl gemahlener Leber g	Anzahl destillierten Wassers ccm	Volumen des Filtrats ccm	Trockengewicht Leber Proz.	Trockengewicht Filtrat total g	Ausbeute an Trockensubstanz Proz.	Aktivität der Leber	Aktivität des Filtrats	Ausbeute an Aktivität Proz.
1	300	300	210	32,02	36,98	38,50	16,6	383,4	285
2	200	200	135	27,35	12,72	23,25	24,8	1443,0	370

Die durch die angewandte Extraktionsmethode erhaltene Ausbeute an Aktivität ist somit völlig zufriedenstellend.

Ehe ich zur Behandlung des Verhaltens der Leberextraktionen bei der Fällung übergehe, möchte ich in der folgenden Tabelle III teils eine Zusammenstellung über die quantitativen Verhältnisse bei den Extraktionen in den in größerem Maßstabe vorgenommenen Reindarstellungsversuchen wiedergeben, für welche sich die Primärziffern im Anhang wiederfinden (siehe S. 336), teils einen Beitrag zur Kenntnis der Einwirkung der Acidität und Temperatur auf das Leberextrakt liefern.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Anzahl			Aktivität des Filtrats	Total-Trockengewicht im Filtrat	Ausbeute an	
	Leber g	H_2O ccm	Filtrat ccm		g	Trockengewicht Proz.	Aktivität Proz.
[illegible]	500	500	415	931,5	52,12	35,92	404,6
[illegible]	400	400	275	898,8	33,66	28,47	—
[illegible]	500	500	500	520,3	71,60	—	—
[illegible]	500	500	435				
5	500	500	350				
[illegible]	500	500					
7	500	500					

Bei Versuch 3 war die Leber besonders weich und leicht zu mahlen, weshalb auch die Kolierung quantitativ vor sich ging. Dagegen ist die Aktivität nur halb so groß gegenüber dem Normalen, welches beweist, daß das angewandte Verhältnis zwischen den Mengen gemahlener Leber und Wasser angemessen war. Mit einer größeren Menge Wasser würde sicher eine niedrigere Aktivität erhalten worden sein, da mehr inaktives Trockengewicht „in Lösung übergegangen" wäre.

Die erhaltenen „Filtrate" waren natürlich bei weitem keine klaren Lösungen, sondern dunkelbraun und kolloidal; es bildeten sich auch innerhalb 24 Stunden große Mengen Fällung.

3b. *Versuche über die Einwirkung der Acidität auf den Leberextrakt.*

Bei den vorhergehenden Versuchen wurde beobachtet, daß sich die kolloidalen Lösungen, wie sie durch die oben beschriebenen Extraktionen erhalten wurden, mehrere Stunden in Lösung erhielten, während bei Verdünnung sofort Fällung eintrat.

Um diese Fällung zu vermeiden, wurde bei einem folgenden Versuch die Lösung alkalisch gemacht. Die Leber ist bekanntlich ein Organ mit alkalischer Reaktion. Nach dem Aufhören des Lebens geht die Reaktion auf sauer über, unter anderem durch die gebildete Milchsäure. Es wäre ja anzunehmen, daß gerade durch diesen Umstand die Eiweißstoffe zum Koagulieren gebracht werden.

Es wurden abermals 400 g mit 400 ccm Wasser auf 360 ccm Filtrat extrahiert. Verschiedene Proben hiervon verdünnte ich im Verhältnis 1 : 10, mit Zusatz von ungleich großen Mengen Alkali mit Ausnahme einer Probe, die ohne Alkali belassen wurde. Gleichwohl konnte bei sämtlichen Proben am folgenden Tage Fällung konstatiert werden. Eine Probe, und zwar die mit dem höchsten Alkalizusatz, zeigte am folgenden Tage nach der Zentrifugierung eine Acidität von $p_H = 8,54$ Trockensubstanz auf 2 ccm 0,0234 g und $K_{1:100} = 0,0430$, Kat.f. = 367,5. Die Probe ohne Alkalizusatz ergab folgende Werte: $p_H = 6,77$, 2 ccm = 0,0220 g, $K_{1:100} = 0,0400$, Kat.f. = 363,6.

Hieraus geht hervor, daß infolge der Alkalität nur eine unbedeutend größere Menge Enzym und Trockensubstanz in Lösung übergegangen war.

Vier Proben von je 30 ccm der letztgenannten Lösung wurden ½, 1, 10 und 30 ccm 0,1 n Essigsäure zugesetzt, zentrifugiert und auf Aktivität, Trockensubstanz und Acidität geprüft. Folgende Tabelle IV gibt die Resultate wieder.

Tabelle IV.

Versuch Nr.	p_H	$K_{1:100}$	Trockensubstanz auf 2 ccm	Kat.f.	In der Lösung verblieben	
					Trockensubstanz Proz.	Aktivität Proz.
Mutterlösung	6,77	0,0400	0,0220	363,6		
1	5,28	0,0376	0,0128	587,5	59,15	95,57
2	4,83	0,0385	0,0134	574,6	62,94	99,46
3	3,84	0,0300	0,0166	361,4	100,61	100,00
4	3,43	0,0198	0,0110	360,0	100,00	99,01

Wie aus Tabelle IV hervorgeht, fällt bei p_H um 5 herum etwa 40 Proz. der Trockensubstanz aus, während die Aktivität relativ unverändert bleibt. Bei höherer Acidität lösen sich, wie ersichtlich, die Eiweißstoffe wieder auf.

Vom Gesichtspunkt der Reingewinnung ist diese Ausfällung von geringerem Werte, da derselbe Effekt in bedeutend besserer Weise mit Alkoholfällung erreicht werden kann, wie wir dies später finden werden.

3c. Die Einwirkung der Temperatur auf den Extrakt.

H. von Euler und seine Mitarbeiter[1]) fanden eine Thermoaktivierung von Katalasen bei 55° bis 60° teils für Hefekatalase, teils für Enzyme von roten Blutkörpern. Wie die untenstehende Tabelle V an die Hand gibt, konnte dieser Effekt mit den fraglichen Leberextrakten nicht erreicht werden, und zwar aus dem Grunde, weil dieselben so schnell koagulieren, auch bei starker Verdünnung und bei Anwendung von physiologischer Kochsalzlösung. Möglicherweise könnte der Fehler darauf beruhen, daß die Leber erkaltete, ehe sie präpariert wurde. Ließe man die Leber nicht unter 37° abkühlen, so daß die Zellen noch lebend wären, gestaltete sich das Resultat vielleicht anders. Siehe hierüber Tabelle V.

Tabelle V.

Lösung	Temperatur °C	$K_{1:5000}$
0,0943 g/ccm, Kat.f. = 1442,2	20	0,0272
	37	0,0154
	50	koaguliert
	60	"
1. 0,0674 g/ccm, Kat.f. = 949,6	20	0,0128
	40	0,0132
	58	koaguliert
2. Dieselbe Extraktion, jedoch mit physiologischer Kochsalzlösung	20	0,0157
	40	0,0132
	58	koaguliert
Probe 1 und 2 bzw. 1 ccm bis zu 10 ccm H_2O und physiologischer Kochsalzlösung	58	"

4. Aktivierung des Leberextrakts mit Toluol und Alkohol.

Um zu ermitteln, wie sich die Leberextrakte bei Verdünnung mit destilliertem Wasser verhalten, wurden folgende Versuche angestellt:

400 g gemahlene Pferdeleber mit 28,53 Proz. Trockengewicht wurden mit 400 ccm destilliertem Wasser extrahiert. Dies ergab ein Filtrat von 360 ccm, welches insgesamt 42,55 g Trockensubstanz und eine Aktivität von Kat.f. = 804,0 hatte.

Die Ausbeute an Trockensubstanz, die auf dem Wege von der Leber zu dieser Enzymlösung erhalten wurde, betrug 37,3 Proz.

---

[1]) *von Euler* und *Blix*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **105**, 83, 1919; *von Euler* und *Laurin*, ebendaselbst **106**, 312, 1919; *von Euler* und *Borgenstam*, diese Zeitschr. **102**, 124, 1920.

Von diesem Leberextrakt wurden Proben im Verhältnis von 1 : 20, 1 : 10 und 1 : 5 verdünnt und bis zum anderen Tage stehengelassen. Es ergab sich hierbei, daß in allen drei Proben Fällungen entstanden, die sich zu Boden senkten. Die Flüssigkeiten oberhalb derselben waren ebenfalls trübe. Von den letzteren wurden Verdunstungsproben gemacht und die Aktivität gemessen.

Hierbei zeigte es sich, daß 5,1, 17,8 und 21,4 Proz. der Trockensubstanz zu Boden gesunken waren. Die Aktivitäten betragen der Reihenfolge nach: Kat.f. = 2114,0, 2054,0, 1318,0.

Dieses Resultat ist bemerkenswert, da sich die Aktivität der Lösung von der ursprünglichen 804,0 um mehr als die infolge des Auftretens einer inaktiven Fällung verursachte Verminderung der Trockensubstanz verbesserte. Dieses Phänomen läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß mit der Fällung ein Hemmungskörper ausscheidet, oder auch, daß das Enzym erst durch Verdünnung und Zusatz von Toluol vollständig aus den Zellen austritt. *Hier liegt also eine vollständige Parallele mit den Aktivierungen* vor, die *von Euler und Blix*, sowie *von Euler* und *Laurin* zuerst bei Hefekatalasen und dann *von Euler* und *Borgenstam* auch bei den roten Blutkörperchen fanden.

Im nächsten Kapitel werden wir noch ein Beispiel dieser Aktivierung bei einer Lösung antreffen, die anfangs eine Aktivität von Kat.f. = 712,5, am darauffolgenden Tage aber Kat. f. = 1861,0 aufwies.

Gelegentlich der von mir in größerem Maßstabe vorgenommenen Reinigungsversuche, auf welche bereits früher Bezug genommen ist, und deren vollständige Primärzahlen sich im Anhang wiederfinden, wurde in Versuch 2 ein Zunutzemachen dieser Aufaktivierung mit Toluol geprüft. Die fraktionierende Fällungsmethode mit Alkohol, zu welcher meine im nächsten Kapitel behandelten Versuche über die Fällung der Leberextrakte führten, ist jedoch vom präparativen Gesichtspunkt so überlegen, daß sie sämtlichen übrigen Versuchen zugrunde gelegt wurde, und zwar um so mehr deswegen, weil man sich hierbei durch die erste Alkoholfällung nicht allein einer größeren Menge inaktiver Trockensubstanz, sondern auch des Hemmungskörpers entledigt. Hier liegt somit ebenfalls Aufaktivierung vor.

Wie später hervorgehen wird, ist diese Aktivierung an die Anwesenheit von Zellen gebunden. Wenn diese z. B. mit Alkohol ausgefällt werden, kann eine Aktivierung nicht bewirkt werden. Dieses Verhalten ist völlig analog ebenderselben Erscheinung, die *H. von Euler* und seine Mitarbeiter bei Hefezellen und Blutkörperchen entdeckten.

5a. Fällung mit Alkohol.

Bei der Präparation von *Battellis* und *Sterns* Hepatokatalase wurde 1 kg gemahlene Leber mit 1 Liter Wasser extrahiert. Nach der

Kolierung durch Tuch wurde die so erhaltene Emulsion mit dem doppelten Volumen 96proz. Alkohols gefällt.

Die Ausbeute bei diesem Verfahren ist natürlich in hohem Grade von der Beschaffenheit der Leber und der Feinheit des Koliertuches abhängig, im allgemeinen erhielt man aber 700 bis 800 ccm Filtrat und daraus eine Fällung von 70 bis 80 g.

Wenn diese mit H_2O extrahiert wird, geht nur ein Zehntel der Trockensubstanz mit einer Aktivität, schwankend um Kat.f. = 1000, in Lösung über. Da sich die eigene Aktivität der Leber um 20 herum bewegt, ist die Ausbeute an Aktivität von dieser zu den erhaltenen Enzymlösungen also 40 Proz.

Eine nähere Untersuchung über die quantitativen Verhältnisse bei der vorliegenden Alkoholfällung wurde mit Filtraten nach den beiden Extraktionsversuchen vorgenommen, die die Tabelle II enthält.

Tabelle VI.

Versuch Nr.	Totale Trockensubstanz in 50 ccm g	Aktivität	Erhaltene Fällung mit 100 ccm Alkohol g	Gefällte Menge Proz.	Aktivität der Restlösung
1	8,805	383,4	7,1	80,6	1,12
2	4,71	1443,0	3,4	72,2	4,2

Die erste Fällung wurde mit 300 ccm, die letztere mit 150 ccm destillierten H_2O geschüttelt. Ergebnis:

Tabelle VII.

Versuch	Totales Trockengewicht in der Lösung	Aktivität	Ausbeute an	
Nr.	g		Trockengewicht Proz.	Aktivität Proz.
1	0,6920	1493,4	7,86	30,61
2	0,3050	1037,8	6,48	4,66

Die Tabelle VII veranschaulicht, wie die Alkoholfällung in der vorliegenden Form zum offenbaren Schaden für die Aktivität in um so höheren Grade gereichte, je längere Zeit die Abfiltrierung in Anspruch nahm.

Bei den oben behandelten Versuchen über Alkoholfällung der Leberextrakte wurden die erhaltenen Fällungen bis zum nächsten Tage an der Luft getrocknet, ehe sie pulverisiert und zu Lösungen geschüttelt wurden. Dieses verdeutlicht der unten wiedergegebene Versuch, der bedeutend bessere Resultate lieferte, wenn die Alkoholfällung direkt nach der Abzentrifugierung mit Wasser geschüttelt wurde.

Einesteils wird hierbei nicht der Alkohol kürzere Zeit inaktivierend einwirken können, andernteils ist die Fällung so feinkörnig, daß sie leicht wieder in Lösung übergeht. Tatsächlich wurden bei den unten wiedergegebenen Extraktionsversuchen nahezu 70 Proz. Ausbeute an Aktivität bei direkter Schüttelung gewonnen. Die erhaltene Lösung zeigte eine stark rotbraune Farbe.

100 ccm des Filtrats, wie es in den oben angeführten Verdünnungsversuchen (S. 323) angewandt wurde und welches also 11,82 g Trockensubstanz enthielt, wurden mit 200 ccm 96proz. Alkohols gefällt. Die erhaltene Fällung wurde sofort abzentrifugiert und 3 Stunden mit 300 ccm destillierten Wassers geschüttelt. Die so erhaltene Lösung enthielt auf 5 ccm 0,0350 g, also insgesamt 2,1 g, und ergab 1 : 1000 $K = 0{,}0212$, Kat.f. = 3028,6. Ausbeute an Aktivität bei Alkoholfällung war also 66,9 Proz., was als ziemlich befriedigend im Vergleich zu den vorher erhaltenen Ausbeuten 30,61 und 4,66 Proz. in Tabelle VII angesehen werden dürfte.

5b. Eine neue fraktionierende Fällungsmethode für den Leberextrakt.

Um jedoch eine allgemeine Orientierung über das Verhalten des Leberextrakts zu dem vorliegenden Fällungsmittel zu gewinnen, wurden abermals 400 g frische Pferdeleber mit 400 ccm H_2O extrahiert. Das hierbei erhaltene Filtrat, 350 ccm, enthielt auf 1 ccm 0,1228 g Trockensubstanz. Nach Verdünnung im Verhältnis 1 : 5000 ergab sich $K = 0{,}0175$, also Kat.f. = 712,5.

Gleichgroße Mengen hiervon wurden der Reihe nach mit $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$ und 2 Volumen 96proz. Alkohols gefällt. Das Resultat der Untersuchung ist aus Tabelle VIII ersichtlich.

Tabelle VIII.

Probe Nr.	Menge Filtrat ccm	Menge Alkohol ccm	Ausgefällte Menge Trockensubstanz Proz.	Aktivität der Restlösung	Farbe der Restlösung
1	40	20	44,92	2638,9	Dunkelrot
2	30	30	67,29	691,0	Gelbbraun
3	20	30	75,05	3,6	Gelbgrün
4	20	40	78,39	0,0	„

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die anderthalbfache Menge Alkohol ausreicht, um das Enzym vollständig auszufällen.

Es fallen ferner 45 Proz. der Trockensubstanz bei dem halben Volumen Alkohol aus, ohne daß etwas vom Enzym mitfolgt. Für ein rationelles Ausnutzen der Alkoholfällung zur Reingewinnung von Katalasen dürfte es daher zweckmäßig sein, die Fällung zuerst mit

dem halben und danach mit dem ganzen Volumen vorzunehmen, worauf die zuletzt erhaltene Fällung sofort mit Wasser vermengt und geschüttelt wird.

Das Bemerkenswerteste ist jedoch, wie bereits hervorgehoben, daß die Restlösung in Versuch 1 durch die Ausfällung von 45 Proz. inaktiver Trockensubstanz allein nicht aktiviert wurde.

Eine andere Aktivierung trat offenbar ein.

Die Mutterlösung ergab nämlich $1:5000\ K = 0{,}0175$ und diese Restlösung $1:5000\ K = 0{,}0238$, obgleich sie mit dem halben Volumen Alkohol verdünnt wurde.

Nachdem ein anderer Teil der ursprünglichen Enzymlösung auf ein Zehntel verdünnt und Toluol zugesetzt worden war, zeigte dieser am folgenden Tage eine Aktivität von Kat.f. = 1861,0, verglichen mit der ursprünglichen, 712,5.

Daß die fraktionierte Fällung rational ist, bewahrheitete sich bei nachstehenden, in größerem Maßstab vorgenommenen Versuchen.

Tabelle IX.

Versuch Nr.	Trockengewicht im Filtrat g	Aktivität des Filtrats	Volumen des Filtrats ccm	Volumen der Schüttellösung ccm	Total-Trockengewicht g	Aktivität	Ausbeute an Trockengewicht Proz.	Ausbeute an Aktivität Proz.
1	43,96	931,5	350	800	3,04	6447,4	6,92	47,86
2	33,66	898,8	275	600	8,88	2466,0*)	26,38	72,38
3	71,60	520,3	500	575	2,76	4687,5	3,85	34,73
4			435	620	3,78	4508,2		
5			350	600	2,66	6193,7		
6				600	3,50	3595,9		
7				600	2,88	6562,5		

*) Toluolbehandlung nach der ersten Alkoholfällung.

Nach der Tabelle IX beträgt die Ausbeute bei diesem Prozeß 4 bis 8 Proz. an Trockengewicht und 35 bis 50 Proz. an Aktivität, wodurch eine Aufaktivierung um das Acht- bis Neunfache erreicht wird. Das Gesamttrockengewicht bewegt sich um 3 g, und die Aktivität schwankt zwischen Kat.f. = 4000 bis 6000. Die fraktionierte Fällung muß daher als eine besonders gute Arbeitsmethode angesehen werden. Für die rein präparative Arbeit liegt nun noch die Aufgabe vor, die Reinigung mittels der Adsorptionsmethode fortzusetzen. Es hat sich später gezeigt, daß das Enzym im hochaktiven Stadium sehr instabil ist, und natürlich ganz besonders in sehr verdünnten Lösungen. Es wurde weiter die Erfahrung gemacht und hat sich auch für Katalase bewahrheitet, daß das Enzym ungleich starke Verwandtschaft zum Adsorptionsmittel in den verschiedenen Stadien der Reinigungsarbeit besitzt. Es sei zunächst als Exempel das Verhalten der Saccharase auf Kaolin angeführt. Unter diesen Umständen könnte man also in Erwägung

ziehen, ob es nicht vorteilhafter wäre, nicht mit einer so kräftig aufaktivierenden Prozedur wie der fraktionierten Fällung mit Alkohol anzusetzen, sondern an Stelle dessen eine schwächere, z. B. Toluolaktivierung anzuwenden, und erst dann die Adsorptionsarbeit mit mehr Trockensubstanz, die niedrigere Aktivität besitzt, zu beginnen. Hiernach könnte ja die Adsorptionsmethode auf die Spitze getrieben werden, teils durch Wahl einer passenden Menge Adsorbens, teils durch eine vorteilhafte Elutionsmittelkonzentration. Mit anderen Worten: Wenn man, von viel Trockensubstanz ausgehend, eine große Menge Enzym an eine kleine Menge Adsorbens adsorbiert hat, dann könnte man vielleicht durch eine schwache Eluierung eine relativ stärkere Enddialyselösung erhalten, die geringere Neigung zur Inaktivierung besitzt, als wenn man bereits eine hohe Aktivität und wenig Trockensubstanz in der Ausgangslösung hat. Wird diese mit der gleichen Menge Adsorbens wie im erstgedachten Falle adsorbiert, bedarf es einer stärkeren Elutionsflüssigkeit, um eine Enddialyselösung mit demselben Gehalt wie im vorhergehenden Falle zu erreichen, welche deshalb stärkere Tendenz zur Inaktivierung zeigt.

Nach dieser Hypothese wurde Versuch 2 ausgeführt. Sie erwies sich jedoch als unrichtig. Es ist zwar richtig, daß eine Lösung mit hoher Aktivität und wenig Trockensubstanz ebensoviel Adsorbens beansprucht wie eine Lösung mit viel Trockengewicht und geringer Aktivität. Jedoch geht andererseits die Elution nicht leichter mit dem Adsorbat der letzteren Lösung vonstatten.

Aus dem Vorhergehenden erhellt, daß durch direkte Toluolaktivierung des Leberextrakts seine Aktivität von 700 bis 900 auf etwa 2000 steigt. Im Versuch 2 ist, um nicht zuviel Trockengewicht mitzubekommen, der Extrakt zuerst mit seinem halben Volumen Alkohol gefällt und mit Toluol bis zum folgenden Tage aktiviert worden, worauf die Adsorptionsarbeit begann.

Um eine bessere Vorstellung zu bekommen, wie die fraktionierende Fällungsmethode arbeitet, wurden in den Versuchen 1 und 2 die Aktivitäten der Zwischenlösungen bestimmt und in Tabelle X zusammengestellt.

Tabelle X.

Versuch Nr.	Ursprüngliche Lösung		Lösung nach der ersten Alkoholfällung		Ausbeute an	
	Totaltrockengewicht	Aktivität	Trockengewicht	Aktivität	Trockengewicht Proz.	Aktivität Proz.
1	43,96	931,5	14,94	3133,2	33,99	114,3
2	33,66	898,8	12,45	2084,0	36,99	85,76

Tabelle X (Fortsetzung).

Schüttellösung		Ausbeute bei der letzten Fällung an	
Trockengewicht g	Aktivität	Trockengewicht Proz.	Aktivität Proz.
3,04	6447,4	20,35	41,87

Die erste Alkoholfällung mit dem halben Volumen Alkohol kann augenscheinlich, wie wir bereits früher gefunden haben, mehr als 100 Proz. Ausbeute an Aktivität ergeben. Die Ausbeute an Trockengewicht bewegt sich um 35 Proz., und das Resultat ist eine Aufaktivierung von 300 bis 400 Proz.

Die Ausbeute an Trockengewicht unterscheidet sich wesentlich von dem vorigen Resultat (siehe Tabelle VIII über diese Frage), man muß jedoch den unerhört variierenden Grad von Dispersität im Auge behalten, den das Leberextrakt tatsächlich besitzt. Die prozentuale Ausfällung ist weiter von dem absoluten Gewicht der Fällung sehr abhängig, da sie Salze und andere gelöste Stoffe durch die Adsorption mit sich zieht. Diese Versuche hatten nur den Zweck, eine gute Arbeitsmethode zu erreichen, und dieser kann auch als erfüllt angesehen werden.

Die zweite Phase der Ausfällung mit der gleichen Menge Alkohol und unmittelbar darauf folgender dreistündiger Schüttelung mit Wasser ergibt 20 Proz. Ausbeute an Trockengewicht, etwa 40 Proz. Ausbeute an Aktivität und also die Verdoppelung der letzteren. Die erhaltenen Endlösungen sind anfangs auch vollständig klar und hochrot in der Farbe.

Bei näherem Studium des Versuchs 2 finden wir, daß wir nach der Alkoholfällung 12,45 g mit Kat.f. = 2084,0 und nach der Behandlung mit Toluol während der Nacht und Abzentrifugierung der entstandenen Fällung 8,88 g mit Kat.f. = 2466,0 erhalten. Die Ausbeute an Aktivität hierzwischen ist 84,40 Proz. Eine Aktivierung ist also nicht eingetreten. Die Alkoholfällung hat den Hemmungskörper bereits weggeführt, und Toluol vermag eine echte Lösung des vorhandenen Enzyms sichtlich nicht zu aktivieren.

Wir gehen nun zur Adsorptionsarbeit über.

6. *Fortgesetzte Reingewinnung mit $Al(OH)_3$ als Adsorbens.*

In meiner vorhergehenden Untersuchung über das Verhalten des Enzyms Katalase zum Adsorptionsmittel standen mir geringere Mengen Trockensubstanz in den Ausgangslösungen, mit welchen die Adsorption vorgenommen wurde, zur Verfügung. Dies beruhte, wie im vorhergehenden dargetan, auf einer weniger zweckmäßig begonnenen Be-

handlung. Sie waren jedoch für eine erste Orientierung über die Voraussetzungen für eine aussichtsreiche Bearbeitung der Aufgabe völlig ausreichend und außerdem leicht zugänglich, da ein im farbigen Vakuumexsikkator verwahrtes Präparat, *Battellis* und *Sterns* Hepatokatalase, seinen Wirkungsgrad während dreier Monate unverändert beibehält. Es konnten deshalb durch Schütteln mit Wasser Enzymlösungen mit relativ übereinstimmendem Gehalt und gleicher Aktivität für wiederholte kleinere Untersuchungen erhalten werden.

Trotz der Schwankung des Adsorptionsvermögens, mit der man natürlich jederzeit auch bei verschiedenen Präparaten von Kaolin- und $Al(OH)_3$-Suspensionen, die nach übereinstimmender Methode präpariert sind, rechnen muß, und vor allem trotzdem, daß meine jetzigen Ausgangslösungen eine ganz andere Vorgeschichte als die vorigen besitzen, so bestätigten meine fortgeführten Versuche im großen und ganzen doch die früher gemachten Erfahrungen auf diesem Gebiete.

So wird das Enzym bei der Anwendung von gleichen Mengen Enzym und Adsorptionsmittel aus den Schüttellösungen nach der fraktionierenden Alkoholfällung in Tabelle IX ziemlich vollständig adsorbiert.

Tabelle XI.

Versuch Nr.	Trockengewicht der ursprünglichen Lösung g	Kat.f.	$Al(OH)_3$ g	Trockengewicht der Restlösung	Aktivität	Elutionsflüssigkeit. Na_2HPO_4-Konzentration Proz.
2	8,88	2466,0	8,200	2,74	8,6	1,269
3	2,76	4687,5	3,567	0,7685	632,1	1,269
4	3,78	4508,2	6,540	1,953	623,8	0,423
5	2,66	6193,7	7,134	0,936	7,31	0,846
6	3,50	3595,9	7,134	1,476	1872,0	—

Die ursprüngliche Lösung im Versuch 2 hat, wie bekannt, eine abweichende Vorbehandlung erfahren. Das Adsorbat in Versuch 6 wurde auf seine Neigung geprüft, an Natriumphosphatlösungen verschiedener Konzentration das adsorbierte Enzym abzugeben, was unten näher erläutert wird.

Die Elutionen in den Versuchen 3 und 5 ließ ich 24 Stunden, die in den Versuchen 2 und 4 48 Stunden dialysieren, worauf sie auf die Trockensubstanz und Aktivität geprüft wurden, obwohl diese Ziffern natürlich wegen der Unvollständigkeit der Dialyse nur eine annähernde Vorstellung über diese Größen geben können. Die Dialysen wurden, wie früher, gegen destilliertes Wasser vorgenommen, welches alle 12 Stunden gewechselt wurde, sowie in Kollodiumsäcken.

Hierauf wurde in den Versuchen 3, 4 und 5 die Adsorption erneuert.

Tabelle XII.

Versuch Nr.	Trockengewicht des Dialysats	Aktivität	$Al(OH)_3$	Trockengewicht der Restlösung	Aktivität der Restlösung
3	1,306 g	5 454,5	1,7835 g	0,7920 g	1333,3
4	0,5616 g	12 325,6	6,658 g	0,3740 g	1975,0
5	> 1,08 g	5 000,0	4,756 g	0,5460 g	7,7

Die verlängerte Dialyse in Versuch 4 hat sichtbarlich eine höhere Aktivität und weniger Trockensubstanz als die übrigen bewirkt. Die Aktivität hier ist um mehr als das Doppelte gestiegen und die Trockensubstanz hat bis auf ein Siebentel abgenommen. Bei noch weiter fortgesetzter Dialyse wäre die Aktivität vermutlich bis auf einen Grad gestiegen, entsprechend dem in meiner früher herausgegebenen Abhandlung auf das Vier- bis Fünffache Konstatierten.

Das Adsorbat nach der zweiten $Al(OH)_3$-Adsorption wurde mit Na_2HPO_4-Lösungen eluiert, wie sie bei den ersten Adsorbaten in Tabelle XI angewandt wurden. Die darauf folgende Dialyse wurde auf 4 bis 5 Tage ausgedehnt, wobei sich folgende Endlösungen ergaben:

Tabelle XIII.

Versuch Nr.	Volumen des Enddialysats ccm	Trockengewicht des Enddialysats g	Aktivität	Aschengehalt Proz.	Eisengehalt Proz.
3	290	0,1044	11 444,4	11,33	3,33
4	258	0,0258	3 100,0	—	—
5	180	0,0144	10 875,0	11,68	3,89

Zwecks Bestimmung der Aschen wurden die Lösungen in abgewogenen Quarzschalen eingedunstet und eingeäschert. Nach Aufschließung mit saurem Kaliumsulfat nahm ich die Eisenbestimmungen nach *Friedenthals* und *Lachs*' oben angeführter kolorimetrischer Methode vor.

In Versuch 4 brachte die wiederholte $Al(OH)_3$-Adsorption und Elution eine ansehnliche Aktivitätsverschlechterung mit sich, obwohl der Gegensatz beabsichtigt war.

Es scheint mir trotzdem, als könne der Sprung von einer Aktivität von 12000 bis auf die höchst erreichbare nicht so außerordentlich groß sein, weshalb die Elution, die nach der Adsorption eines Präparats mit der ursprünglichen Aktivität von dieser Größe erhalten wird, so wesentlich aktiv ist, daß sie um so leichter inaktiviert wird. Die Unvollständigkeit der Adsorption dürfte darauf beruhen, daß die Affinität des Enzyms zu $Al(OH)_3$ mit steigender Aktivität abnimmt.

In Versuch 2 wurde die Adsorptionsfähigkeit zwischen $Al(OH)_3$ und Kaolin verglichen.

Tabelle XIVa.

Ausgangslösung			Adsorbiert mit		Dialyse
Volumen ccm	Trockengewicht g	Aktivität	$Al(OH)_3$ g	Kaolin g	
215	0,2473	> 9304,3	0,7134	—	5 . 24 Stdn.
350	0,3780	> 7963,0	—	3,4195	—

Tabelle XIVb.

Restlösung		Endlösung			Ausbeute an	
Trockengewicht g	Kat.f.	Volumen ccm	Trockengewicht g	Kat.f.	Trockengewicht Proz.	Aktivität Proz.
0,1078	195,7	98	0,0333	4529,4	13,47	6,56
0,3000	6412,5	110	0,0220	3250,0	5,82	2,38

Der Unterschied in der Aktivität der beiden Ausgangslösungen beruht darauf, daß die letztere 24 Stunden länger als die erstere dialysiert wurde. Beide Versuche liefern besonders unzufriedenstellende Ausbeute, der Vorzug dürfte jedoch mit Hinsicht auf das geringe Unterscheidungsvermögen, welches das Kaolin in diesem Stadium der Reinigung zu besitzen scheint, der $Al(OH)_3$-Adsorption zu geben sein. Die Restlösung nach der Adsorption hat ja eine nahezu gleiche Aktivität als die Ausgangslösung.

Eigentlich könnten die quantitativen Verhältnisse betreffs der Ausbeute an Trockensubstanz und Aktivität bei der Reingewinnung mittels der $Al(OH)_3$-Methode aus dem fraktioniert gefällten Leberextrakt bereits jetzt einer Diskussion unterworfen werden. Zum Zwecke eines besseren Vergleichs ist es jedoch vorteilhafter, hiermit zu warten, bis die Versuche mit Kaolin besprochen worden sind.

Bereits jetzt kann jedoch festgehalten werden, daß die Reinigung mit $Al(OH)_3$ zu Präparaten mit Aktivitäten zwischen 10000 und 12000 führt, da, wie ich früher fand, die Adsorption zwar mit sehr kleinen Mengen Suspension vorgenommen werden kann; doch scheint die Trockensubstanz im übrigen ebenfalls leicht zu adsorbieren und ohne größere Schwierigkeit eluiert zu werden; letzterer Umstand steht im Gegensatz zum Verhalten des Kaolinsorbats. Mit Kaolin konnte dagegen die Reinigung weit über meine vorhergehenden Resultate hinausgeführt werden, wobei auch, wie bereits hervorgehoben, Präparate mit höherer Aktivität in solchen Mengen erhalten wurden, welche eine nähere Charakteristik durch Analyse gestatten.

Wie wir später sehen werden, ist die Inaktivierung bei der Dialyse besonders groß. Dies könnte möglicherweise auf der Basizität der

Elutionsflüssigkeit beruhen. Nach *Ronas* und *Damboviceanus*[1]) Untersuchung beginnt die Zerstörung des Enzyms erst bei $p_H = 10$ und darüber. Da meine Elutionsflüssigkeiten aus Na_2HPO_4-Lösungen ohne Alkalizusatz bestanden und p_H somit 9 nicht überstieg, dürfte die Ursache anderswo liegen. In den Versuchen 1 bis 3 wurden die Elutionslösungen nach der Elution nicht neutralisiert, wogegen dies in den folgenden Versuchen durch Zusatz einer Essigsäuremenge geschah, welche p_H von der alkalischen Seite in den optimalen überführte. Dieses Beachten der Acidität scheint jedoch mit einer entsprechenden Verminderung in der Größe der Inaktivierung nicht zu korrespondieren.

Es wäre vielleicht denkbar, daß das Phosphat in höheren Konzentrationen einen besonderen Einfluß auf die aktiven Gruppen des Enzyms ausübe. Hierüber wurden Versuche angestellt, die später behandelt werden sollen.

In Versuch 6 wurde die Reingewinnungsarbeit mit dem Adsorbat, das bei der Adsorption eines fraktionierten Leberextrakts mit $Al(OH)_3$ gewonnen wurde, nicht zu Ende geführt, sondern statt dessen studierte ich die Einwirkung des Phosphats hierauf bei verschiedenen Konzentrationen.

Tabelle XVa.

Versuch Nr.	Menge Adsorbat g	Davon Gewicht adsorbierten Enzyms g	Elutionsflüssigkeit Konzentration Proz.	p_H
1	1,321	0,2924	0,423	8,75
2	1,321	0,2924	0,212	8,64
3	1,321	0,2924	0,042	8,64
4	1,321	0,2924	0,004	8,67
		Kat.f. = 3761,9		

Tabelle XVb.

Versuch Nr.	Aktivität der Elution sofort K (1 : 100)	Aktivität der Elution nach 96 Stunden K	Totaltrockengewicht g	Kat. f.	Ausbeute an Trockengewicht	Ausbeute an Aktivität
1	0,0771	(1 : 100) 0,0195	0,0400	4875,0	13,68	17,73
2	0,0329	(1 : 100) 0,0151	0,0180	8388,9	6,16	13,73
3	0,0025	(1 : 10) 0,0224	0,0200	1120,0	6,84	2,04
4	0,0020	(1 : 10) 0,0033	0,0100	330,0	3,42	0,30

Wie aus dem Versuch hervorgeht, steigt die eluierte Menge mit der Phosphatmenge in der Elutionsflüssigkeit, gleichzeitig steigt jedoch die Inaktivierung während der Dialyse, weshalb man im Zwischen-

[1]) *Rona* und *Damboviceanu*, diese Zeitschr. 184, 20, 1922.

register die höchste Aktivität erhält. In den am stärksten verdünnten Lösungen tritt ferner eine gesteigerte Inaktivierung ein. Es ist eine bekannte Tatsache, daß konzentrierte Enzymlösungen haltbarer sind als verdünnte. In sehr verdünnten Lösungen hat *Wieland* Inaktivierung nur durch Evakuierung, mittels Durchblasen von Luft oder Schütteln im Schüttelapparat erreicht.

Diese Versuche wurden einstweilen abgebrochen, da sich das Kaolinverfahren, wie im folgenden gezeigt werden soll, als bedeutend zweckmäßiger erwies. Bei den in meiner kürzlich genannten Abhandlung besprochenen Versuchen konnte ebendieselbe Aktivität schon mit einer Kaolinadsorption erreicht werden, die durch zwei $Al(OH)_3$-Adsorptionen und Elutionen bewirkt wurde.

Mit Hilfe der mir jetzt zu Gebote stehenden größeren Mengen wurden in diesem Punkte bedeutend größere Effekte erzielt.

7. *Reingewinnung mittels des Kaolinverfahrens.*

In den Versuchen 1 und 7 wurde das Kaolinverfahren bei verschieden starken Konzentrationen der Elutionsflüssigkeit studiert.

Tabelle XVIa.

Ausgangslösung			Kaolin	Konz. Na_2HPO_4	Dialyse
Volumen ccm	Trockengewicht g	Kat.f.	g		
800	3,04	6447,4	20,517	m/30	120 Stunden
600	2,88	6562,5	41,034	0,846 Proz.	120 „

Tabelle XVIb.

Restlösung		Endlösung			Aschengehalt	Eisengehalt
Trockengewicht g	Kat.f.	Volumen ccm	Trockengewicht g	Kat.f.		
2,09	3940,9	510	0,0510	20 440,0	—	—
1,062	0,0	700	0,2520	25 000,0	12,09	4,12

Bei einem späteren Versuch erhielt ich eine Aktivität von 22 250,0. Das Kaolinverfahren arbeitet somit besonders zufriedenstellend. Bei dessen Anwendung können Aktivitäten von 20000,0 bis 25000,0 unmittelbar erreicht werden. Durch Wahl einer geeigneten Konzentration der Elutionsflüssigkeit könnte man ferner dafür sorgen, daß die Ausbeute an Trockensubstanz so zufriedenstellend wie möglich ist, eine Aufgabe, die der Zweck der Bearbeitung in kommenden Versuchen sein soll. Bemerkenswert ist, daß trotz des Vorliegens eines so großen Unterschieds in der Stärke des Elutionsmittels die Aktivität der er-

haltenen Präparate im Gegensatz zu dem vorher bei den $Al(OH)_3$-Adsorbaten Festgestellten so weit übereinstimmend erhalten wurde. Man könnte hieraus den Schluß zu ziehen wagen, daß eine einheitliche Substanz eluiert, doch ist das Versuchsmaterial für so weitgehende Betrachtungen zu gering. Tabelle XVIII b sowie meine erste Abhandlung enthalten ebenfalls kleinere Aktivitäten.

Eines steht jedoch fest, nämlich, daß bei rationeller Reingewinnung des Enzyms Katalase nach modernen Methoden die Kaolinadsorption das Glied ist, welches auf die fraktionierte Fällung mit Alkohol folgen muß.

In den kommenden Untersuchungen werde ich weiter die Möglichkeiten untersuchen, die Sache auf dieser Basis durch $Al(OH)_3$-Adsorption oder wiederholte Kaolinadsorption zu fördern. Durch diese Versuche wird es sich offenbaren, wo die höchst erreichbare Aktivität liegt, doch will es mir scheinen, als ob ich ihr in den vorliegenden Versuchen bereits sehr nahe gekommen wäre.

Bevor ich auf eine nähere Beschreibung der Präparate, die das Resultat meiner bisherigen Arbeit sind, deren Eisengehalt und Verhalten zu Blausäure eingehe, weise ich zwecks näheren Studiums auf die im Anhang aufgeführten, bei meinen Reingewinnungsversuchen erhaltenen Primärziffern hin, und will nun die Ausbeuten an Aktivität und Trockengewicht bei den oben beschriebenen Reinigungsversuchen behandeln.

8. Ausbeute an Aktivität und Trockengewicht.

Bei den obigen Versuchen erhielt ich folgende Anfangs- und Endpräparate.

Tabelle XVII.

Versuch Nr.	Ausgangslösung		Endlösung		Ausbeute an	
	Trockengewicht g	Kat.f.	Trockengewicht g	Kat.f.	Trockengewicht Proz.	Aktivität Proz.
3	2,76	4687,5	0,1044	11 444,4	3,78	9,24
4	3,782	4508,2	0,0258	3 100,0	0,68	0,47
5	2,664	6193,7	0,0144	10 875,0	0,54	0,95
1	3,04	6447,4	0,0510	20 440,0	1,68	5,32
7	2,88	6562,5	0,2520	25 000,0	8,75	33,33

Das $Al(OH)_3$-Verfahren ergibt also im besten Falle etwa 10 Proz. Ausbeute an Aktivität und 4 Proz. Ausbeute an Trockengewicht.

Das Kaolinverfahren ergibt dagegen besonders mit stärkerer Elutionsflüssigkeit weitaus bessere Resultate.

In der Tabelle XVIII a werden fünf Parallelversuche über die Kaolinadsorption mit Enzymlösungen wiedergegeben, die aus dem in Kapitel 2 auf Eisengehalt untersuchten Präparat, *Battellis* und

Sterns Hepatokatalase, erhalten wurden. Die Elution wurde hier in m/30 Phosphat vorgenommen, und die Versuche stellen insofern nichts Neues dar, die Endlösungen sollen jedoch in einem der folgenden Kapitel über Blausäurevergiftung von hochaktiven Katalasepräparaten zur Anwendung kommen.

Tabelle XVIIIa.

Versuch Nr.	Totale Menge Enzym in der ursprünglich. Lösung g	Aktivität	Adsorbiert mit Kaolin g	Versuch Nr.	Totale Menge Enzym in der ursprünglich. Lösung g	Aktivität	Adsorbiert mit Kaolin g
1	0,4347	1137,8	4,1034	4	0,2560	2001,0	4,1034
2	0,5781	1365,0	4,1034	5	0,2560	2001,0	4,1034
3	0,4179	873,6	4,7873				

Tabelle XVIIIb.

Inaktivierung während der Dialyse Proz.	Aktivität der Elution Kat.f.	Totales Trockengewicht in der Elution g	Ausbeute an Aktivität Proz.	Aktivitätssteigerung
25,0	8 086,0	0,0101	16,51	7,107 mal
68,8	22 250,0	0,0078	21,99	16,30 „
27,7	8 500,0	0,0099	23,05	9,73 „
28,9	8 356,0	0,0168	27,40	4,18 „
35,4	8 538,0	0,0182	30,33	4,27 „

Anhang zu Kapitel II.

Versuch 1.

500 g Leber wurden mit 500 ccm H_2O extrahiert. Das aus 415 ccm bestehende Filtrat enthielt pro Kubikzentimeter 0,1256 g Trockensubstanz und ergab 1 : 5000 K = 0,0234; Kat.f. = 931,53. Da die Leber eine Aktivität von Kat.f. = 24,0 und einen Trockengewichtsprozent = 29,02 Proz. hatte, war somit die Ausbeute an Trockensubstanz bei dieser Behandlung 35,92 Proz. und die Ausbeute an Aktivität 404,6 Proz.

350 ccm des obengenannten Filtrats wurden mit 175 ccm 96proz. Alkohol gefällt. Die dabei erhaltene Restlösung enthielt 0,0383 g/ccm und ergab 1 : 5000 K = 0,0240. Das Volumen betrug 390 ccm. Aktivität somit Kat.f. = 3133,2.

375 ccm der Restlösung wurden mit dem gleichen Volumen 96proz. Alkohols gefällt und die Fällung unmittelbar nach der Abzentrifugierung mit 800 ccm H_2O geschüttelt. Die so erhaltene Lösung enthielt 0,0038 g/ccm und ergab 1 : 5000 K = 0,0049; Kat.f. = 6447,4.

Die gesamte erhaltene Lösung wurde mit 150 ccm Kaolinsuspension = 20,517 g adsorbiert. Hierbei wurden 31,25 Proz. des Trockengewichts und 27,42 Proz. der Aktivität adsorbiert. Die letztere Proportion ist zwar weniger vorteilhaft, dürfte jedoch darauf beruhen, daß die Adsorption in zu stark konzentrierter Lösung vorgenommen wurde, wobei die Adsorptionen weniger elektiv auszufallen pflegen.

Die Restlösung enthielt 0,0022 g/ccm und ergab 1 : 100 K = 0,0867; Kat.f. = 3940,9.

Bei der letzten Elution wurden m/30 Phosphat sowie etwas Alkali angewandt.

Die Elution ergab unmittelbar $K_{1:1000}$ = 0,0088. Nach 120 Stunden Dialyse ergab sie $K_{1:100}$ = 0,0244. Diese betrug 510 ccm und enthielt 0,0001 g/ccm. Die Aktivität beträgt somit 20440,0 und die totale Trockensubstanz 0,0510 g. Die Inaktivierung während 120 Stunden Dialyse = 72,27 Proz.

Versuch 2.

400 g Leber mit 29,56 Proz. Trockengewicht wurden mit 400 ccm H_2O extrahiert. Von diesen 118,24 g fanden sich 33,66 g oder 28,47 Proz. im Filtrat wieder. Dieses hatte Kat.f. = 898,8.

Hierauf Fällung mit 138 ccm 96 proz. Alkohol und Zentrifugierung. Die Restlösung betrug hierbei 220 ccm und enthielt 12,45 g mit Kat.f. = 2084,0.

Die Lösung wurde bis auf 600 ccm verdünnt und mit Toluol versetzt, sodann bis zum nächsten Tage stehengelassen, wobei Fällung eintrat. Die Lösung wurde dekantiert, wobei die über dem Bodensatz befindliche Flüssigkeit eine Aktivität von Kat.f. = 2466,0 zeigte, also eine schwache Aktivitätssteigerung. Die zusammengelegte Trockensubstanz betrug 8,88 g.

Jetzt wurden 200 ccm $Al(OH)_3$-Suspension zugesetzt, die 8,2 g Trockengewicht enthielt, und zentrifugiert. Rückstand in der Restlösung 2,74 g mit Kat.f.= 8,6.

Die 660 ccm betragende Elution ergab unmittelbar $K_{1:1000}$ = 0,0188, nach 48stündiger Dialyse $K_{1:1000}$ = 0,0107, und enthielt da auf 1 ccm 0,00115 g Trockengewicht; Kat.f. = 9304,3. Die Trockensubstanz betrug somit insgesamt 0,7590 g.

215 ccm hiervon, also mit einem Gehalt von 0,2473 g Trockengewicht, wurden mit 30 ccm $Al(OH)_3$-Suspension adsorbiert, die 0,7134 g Trockengewicht enthielt.

Die Restlösung ergab 1 : 1 K = 0,0861 und enthielt auf 5 ccm 0,0022 g Trockengewicht. Es waren somit fast sämtliche Aktivität sowie 56,41 Proz. der Trockensubstanz adsorbiert worden. Hier, gleichwie bei der ersten Adsorption, hätte weniger Suspension angewendet werden sollen.

Die Elution wurde mit 1,269 proz. Na_2HPO_4-Lösung vorgenommen. Die Lösung war vollkommen klar und von rotgelber Farbe, betrug 98 ccm und ergab unmittelbar $K_{1:1000}$ = 0,0133.

Nach 120 Stunden Dialyse ergab dieselbe jedoch nur $K_{1:100}$ = 0,0154 und enthielt 0,0034 g auf 10 ccm; Kat.f. = 4529,4. Gesamttrockengewicht 0,0333 g.

Am nächsten Tage wurde ein anderer Teil des Dialysates nach vorausgegangener $Al(OH)_3$-Adsorption für weitere Reinigung mit Kaolinadsorption in Gebrauch genommen.

Das Dialysat ergab nun $K_{1:1000}$ = 0,0086 und enthielt auf 5 ccm 0,0054 g Trockengewicht, Kat.f. = 7963,0.

350 ccm hiervon, mit einem Gehalt von 0,3780 g Trockengewicht, wurden mit 25 ccm Kaolin adsorbiert, das 3,4195 g Verdunstungsrückstand enthielt.

Die Restlösung ergab 1 : 100 K = 0,0513 und enthielt 0,0008 g/ccm. Kat.f. = 6412,5. 20,64 Proz. des Trockengewichts wurden adsorbiert.

Die Elution, die in 1,269proz. Phosphat ausgeführt wurde, hatte eine gelbrote Farbe, war vollkommen klar und ergab 1 : 1000 K = 0,0195. Nach 120 Stunden Dialyse ergab sie nur $K_{1:100}$ = 0,0065 und enthielt 0,0020 g/10 ccm; Kat.f. = 3250,0.

Eine Probe auf die Elution nach der ersten $Al(OH)_3$-Adsorption ergab nach insgesamt 120 Stunden währender Dialyse $K_{1:1000}$ = 0,0316 und enthielt 0,0049 g/10 ccm; Kat.f. = 6449,0.

Inaktivierung bei den Dialysen.

Erste Elution, 2 Tage	43,09 Proz.
„ „ 3 „	54,26 „
„ „ 5 „	83,19 „
Elution nach der zweiten $Al(OH)_3$-Adsorption, 5 Tage	88,42 „
„ „ „ Kaolinadsorption, 5 Tage	96,67 „

Versuch 3.

500 g ganz frischer Leber wurden mit 500 ccm H_2O extrahiert. Das Filtrat von 500 ccm enthielt 0,1432 g/ccm und ergab 1 : 5000 K = 0,0149; Kat.f. = 520,3.

Dieses Filtrat wurde mit 250 ccm Alkohol bei 0° gefällt und zentrifugiert. Die Restlösung wurde mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt, die so erhaltene Fällung abzentrifugiert und mit 600 ccm H_2O 3 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt.

Die so erhaltene Lösung enthielt 0,0048 g/ccm und ergab 1 : 5000 K = 0,0045; Kat.f. = 4687,5. Trockengewicht insgesamt 2,76 g und Volumen 575 ccm.

Hierauf wurde mit 150 ccm $Al(OH)_3$-Suspension = 3,567 g Trockengewicht adsorbiert.

Die Restlösung ergab 1 : 100 K = 0,0067 mit 0,0106 g/10 ccm; Kat.f. = 632,1 mit einem Gesamttrockengewicht von 0,7685 g.

Die sofortige Elution ergab 1 : 1000 K = 0,0220 und betrug 485 ccm.

Nach der Dialyse während der Nacht war das Resultat am nächsten Morgen 1 : 1000 K = 0,0150 mit 0,0275 g auf 10 ccm; Kat.f. = 5454,5.

Das Volumen betrug jetzt 475 ccm. Nun wurde mit 75 ccm $Al(OH)_3$-Suspension = 1,7835 g Trockengewicht adsorbiert.

Die Restlösung ergab $K_{1:100}$ = 0,0192 und enthielt 0,0144 g/10 ccm; Kat.f. = 1333,3. Gesamttrockengewicht 0,7920 g.

Die Elution belief sich auf 290 ccm und ergab unmittelbar 1 : 1000 K = 0,0163. Nach 120stündiger Dialyse ergab dieselbe 1 : 100 K = 0,0412 und enthielt 0,0036 g/10 ccm; Kat.f. = 11 444,4. Gesamttrockengewicht 0,1044 g.

Inaktivierung bei den Dialysen.

Erste Elution, 24 Stunden	31,82 Proz.
Zweite Elution, 120 Stunden	74,72 „

Versuch 4.

Bei der Extraktion von 500 g Leber wurden 435 ccm Filtrat erhalten, welches fraktioniert mit Alkohol gefällt wurde. Die letzte Fällung wurde

mit Wasser 3 Stunden geschüttelt. Nach der Filtrierung erhielt man eine Lösung von 620 ccm, welche auf 2 ccm 0,0122 g Trockensubstanz enthielt und 1 : 5000 K = 0,0055 ergab; Kat.f. = 4508,2.

Nach Ansäuerung mit 30 ccm 0,1 n HAc wurde mit 275 ccm $Al(OH)_3$-Suspension = 6,540 g Trockengewicht adsorbiert. Hierauf wurde mit 560 ccm 0,423 proz. Na_2HPO_4-Lösung eluiert und 93 ccm 0,1 n CH_3COOH zugesetzt. Die Elution ergab unmittelbar 1 : 1000 K = 0,0153. Nach 48-stündiger Dialyse wurde $K_{1:1000}$ = 0,0106 erhalten, wobei die Lösung 0,0043 g/5 ccm enthielt; Kat.f. = 12325,6. Die Restlösung von 930 ccm enthielt auf 2 ccm 0,0042 g und ergab 1 : 100 K = 0,0131; Kat.f. = 623,8. Gesamttrockensubstanz = 1,953 g.

Nach der Dialyse wurde mit 280 ccm $Al(OH)_3$-Suspension mit 6,6584 g Trockengewicht eine zweite Adsorption vorgenommen.

Die Restlösung enthielt 0,0004 g/1 ccm und ergab 1 : 100 K = 0,0079; Kat.f. = 1975,0. Gesamttrockengewicht 0,3740 g; Volumen 935 ccm.

Nach 168 Stunden Dialyse ergab die Lösung $K_{1:100}$ = 0,0031, nachdem sie im Anfang $K_{1:1000}$ = 0,0063 ergeben hatte. Sie enthielt da 0,0001 g/ccm und hatte ein Volumen von 258 ccm. Gesamttrockengewicht 0,0258 g; Kat.f. = 3100,0.

Inaktivierung bei den Dialysen.

Erste Elution, 48 Stunden	30,72 Proz.
Zweite Elution, 168 Stunden . . .	95,08 „

Versuch 5.

500 g Leber ergaben 350 ccm Filtrat und wurden zuerst mit 175 ccm und danach mit 365 ccm gefällt. Die letztere Fällung wurde mit 600 ccm H_2O geschüttelt.

Die Schüttellösung enthielt 0,0444 g/10 ccm und ergab 1 : 5000 K = 0,0055; Kat.f. = 6193,7. Gesamttrockengewicht 2,664 g.

Hierauf wurde mit 300 ccm $Al(OH)_3$-Suspension (= 7,134 g) adsorbiert.

Die Restlösung enthielt 0,0104 g/10 ccm und ergab 1 : 1 K = 0,0076; Kat.f. = 7,31. Totaltrockengewicht 0,936 g.

Die Elution ergab unmittelbar 1 : 1000 K = 0,0083 und nach der Dialyse bis zum folgenden Tage 1 : 1000 K = 0,0054. Diese enthielt 0,0108 g/10 ccm bei einem Volumen von 1000 ccm. Gesamttrockengewicht 1,08 g. Kat.f. = über 5000,0.

Ein Teil der Elution dialysierte insgesamt 6 Tage und hatte dann Kat.f. = 2124,5. Hierbei hatte sich das Trockengewicht von dem ursprünglichen auf 29,63 Proz. vermindert, und die Aktivität war gleichfalls von der ursprünglichen auf 12,59 Proz. herabgegangen.

Der größte Teil der Elution wurde am nächsten Tage mit 200 ccm $Al(OH)_3$-Suspension (= 4,756 g) adsorbiert.

Die 910 ccm betragende Restlösung enthielt 0,0060 g/10 ccm und ergab 1 : 1 K = 0,0046; Kat.f. = 7,7. Gesamttrockengewicht 0,5460 g.

Die Elution, welche 180 ccm umfaßte, ergab unmittelbar 1 : 1000 K = 0,0126 und nach 120stündiger Dialyse $K_{1:100}$ = 0,0087 und enthielt 0,0008 g/10 ccm; Kat.f. = 10875,0. Totaltrockengewicht 0,0144 g.

Das Schlußpräparat wurde im Hinblick auf den Aschen- und Eisengehalt untersucht.

Inaktivierung bei den Dialysen.

Erste Elution, 24 Stunden	34,94 Proz.
„ „ 144 „	87,41 „
Zweite Elution, 120 Stunden . . .	93,10 „

Versuch 6.

Die Elutionswirkung des Phosphats auf das $Al(OH)_3$-Adsorbat.

500 g Leber wurden extrahiert und fraktioniert gefällt. Hierbei wurde später eine Schüttellösung von 600 ccm erhalten, welche 1 : 5000 K = 0,0042 ergab und 0,0292 g auf 5 ccm enthielt; Kat.f. = 3595,9; Gesamttrockengewicht 3,504 g.

Diese Lösung wurde mit 300 ccm $Al(OH)_3$-Suspension (7,134 g Trockengewicht) adsorbiert. Die Restlösung ergab 1 : 100 K = 0,0307 und enthielt 0,0082 g auf 5 ccm; Kat.f. = 1872,0; Gesamttrockengewicht 1,476 g.

Das Adsorbat wurde in Wasser aufgeschwemmt. Die Suspension ergab 1 : 5000 K = 0,0044 und enthielt auf 5 ccm 0,1321 g. Die Aktivität der adsorbierten Trockensubstanz stellt sich somit auf Kat.f. = 3761,9.

Vorher waren vier verschiedene Lösungen von Na_2HPO_4, und zwar: 1. 0,424-, 2. 0,212-, 3. 0,042- und 4. 0,04proz., zubereitet worden. Die Acidität derselben hatte folgende Werte:

	1	2	3	4
p_H = . .	8,75	8,64	8,64	8,67

50 ccm der Adsorbataufschwemmung wurden 10 Minuten mit den gleichen Volumen der obengenannten Lösungen geschüttelt, hierauf zentrifugiert und mit CH_3COOH bis auf ein Volumen von 100 ccm neutralisiert. Die Lösungen ergaben unmittelbar darauf:

	1	2	3	4
$K_{1:100}$ =	0,0771	0,0329	0,0025	0,0020

Wie ersichtlich, ist die eluierte Menge Aktivität von der Phosphatmenge deutlich abhängig. Auf die Aktivität des Adsorbats beträgt sie, ausgedrückt in Prozenten:

1 Proz.	2 Proz.	3 Proz.	4 Proz.
70,1	29,91	2,27	1,82

Nach 96stündiger Dialyse erhielt ich folgende Werte:

Dialyse $n:r$:	1	2	3		4
$K_{1:100}$	0,0195	0,0151	$K_{1:10}$	0,0224	0,0033
Trockengewicht auf 5 ccm in g .	0,0020	0,0009		0,0010	0,0006
Kat.f. = ...	4875,0	8388,9		1120,0	330,0
Inaktivierung in Proz.	74,71	54,10		10,40	83,50

Versuch 7.

Nach der üblichen Extraktion und fraktionierten Fällung mit Alkohol wurde eine Schüttellösung von 600 ccm erhalten, welche 0,0240 g/5 ccm enthielt und 1 : 5000 K = 0,0063 ergab; Kat.f. = 6562,5. Gesamttrockengewicht 2,88 g. Dieses wurde mit 300 ccm Kaolin-Suspension = 41,034 g Trockengewicht adsorbiert.

Die Restlösung enthielt insgesamt 1,062 g inaktive Trockensubstanz.

Die Elution wurde mit 0,846proz. Phosphat vorgenommen. Diese betrug 700 ccm. Die Lösung ergab unmittelbar $K_{1:1000}$ = 0,0147 und enthielt 0,0431 g/5 ccm. Nach 48stündiger Dialyse wurden $K_{1:1000}$ = 0,0103 und 0,0041 g/5 ccm erhalten. Kat.f. = 12561,0 und nach 120stündiger Dialyse $K_{1:1000}$ = 0,0090 und 0,0018 g/5 ccm; Kat.f. = 25000,0.

Das Präparat mit Kat.f. = 25000,0 wurde auf Aschen- und Eisengehalt sowie Stickstoff untersucht. Aschengehalt 12,09 Proz., Eisengehalt 4,12 Proz., Stickstoffgehalt 12,94 Proz.

Inaktivierung bei den Dialysen.

Elution nach 48 Stunden	29,93 Proz.
„ „ 120 „	38,78 „

Daß diese Inaktivierungen, im Vergleich zu den vorhergehenden gering sind, dürfte darauf beruhen, daß es bedeutend leichter ist, die Kaolinelutionen vollkommen klar zu erhalten, was demgegenüber mit den $Al(OH)_3$-Adsorbaten, auch bei Anwendung von Kieselgur beim Filtrieren, fast unmöglich ist, da das Adsorbens in alkalischer Lösung in kolloidale Lösung übergeht. Später tritt eine sehr unbedeutende Fällung ein, die jedoch ein wenig adsorbiertes Enzym enthält.

IIIa. Der Eisengehalt hochaktiver Katalasepräparate.

Die Enddialysen aus den oben beschriebenen Reingewinnungsversuchen bestanden aus klaren Lösungen, die jedoch nach und nach etwas mehr kolloidal wurden, um zuletzt Fällungen abzusetzen. Der Rückstand nach der Verdunstung bestand aus einer hornartigen, grünen Substanz.

In den Versuchen 3, 5 und 7 wurden die Endprodukte auf Aschen- und Eisengehalt untersucht, außerdem ergaben die Adsorptionen in Tabelle XVIII ein Gesamtpräparat, mit welchem dieselben Bestimmungen vorgenommen werden konnten.

Nach der Einäscherung auf dem Meckerbrenner in der Quarzschale verblieb ein bräunlich-weißer Rückstand. Dieser wurde mit

$KHSO_4$ aufgeschlossen und dann der Eisengehalt nach *Friedenthals* und *Lachs'* oben zitierter kolorimetrischer Methode bestimmt[1]).

Warburg hat bei seinen Untersuchungen über die Oxydation der Aminosäuren, wie ich bereits hervorhob, gefunden, daß Eisen in lebenden Zellen und in Blutkohle einen Sauerstoffverbrauch von gleicher Größenordnung pro Gewichts- und Zeiteinheit bewirkt, und er sieht in diesem Umstand eine Stütze für seine Theorie über die Mechanik der Oxydationsprozesse. Ferner hat *Willstätter*[2]) bei seiner ersten Untersuchung über die Peroxydase die Eisengehalte der Präparate verschiedenen Reinheitsgrades studiert und aus der eventuellen Aktivität des vorhandenen Eisens gewisse Schlüsse betreffs der Peroxydase als Eisenverbindung gezogen, auf welche ich später zurückkommen werde.

Es war deshalb von großem Interesse zu sehen, in welcher Proportion die Aktivität meines Präparats, auf die Eisenmenge als einzige aktive Gruppe gerechnet, zu diesen bereits vorhandenen Werten stehen würde.

Warburg drückt seine Aktivitäten in folgenden Dimensionen aus:

$$\text{cmm } O_2/\text{mg Fe . Stunde.}$$

Die höchste Aktivität beim Eisen hat er bei dessen Katalyse der Oxydation Cystein zu Cystin gefunden, und diese betrug in obenstehendem Maße[3]):

$$400000 \text{ cmm } O_2/\text{mg Fe . Stunde.}$$

Der Berechnung der vorliegenden Größe für die Präparate, die nach dem Obenstehenden auf ihren Eisengehalt geprüft wurden, konnten die unmittelbar erhaltenen Ziffern nicht zugrunde gelegt werden, da die Versuchszeiten nur 25 Minuten betrugen. Einfache Aufproportionierung kann nicht vorgenommen werden, weil die Umsatzkurve logarithmisch ist.

Aus dem Umstand, daß, wie Tabelle I, S. 319, zeigt, die Reaktionskonstante innerhalb weiter Grenzen unabhängig von der Substratkonzentration ist, kann man annehmen, daß die ursprüngliche Normalität H_2O_2 bei den Versuchen, bei denen die Aktivität des genannten Präparats bestimmt wurde, 0,01 betrug. Mit der bekannten Aktivität, dem Trockengewicht Enzym auf 50 ccm Reaktionsmischung sowie der Ausgangsnormalität kann die Normalität H_2O_2 in der Reaktionsmischung nach 60 Minuten berechnet werden.

---

[1]) Siehe S. 320.
[2]) *Willstätter*, Liebigs Ann. **416**, 21; **422**, 47; **430**, 269.
[3]) Diese Zeitschr. **152**, 481, 1924.

Mit Hilfe der Anfangs- und Endkonzentration führt weiter eine einfache Rechnung zu dem entwickelten Sauerstoffvolumen. Dasselbe wird seinerseits mit dem Produkt der zu 50 ccm Reaktionsmischung zugesetzten Enzymmenge und deren entsprechendem Prozentgehalt Eisen dividiert.

Die Tabelle XIX enthält die Primärzahlen und das Resultat dieser Berechnungen.

Tabelle XIX.

Aktivität	Trockengewicht in 50 ccm Reaktionsmischung g	Eisengehalt Proz.	cmm O_2/mg Fe . Stunde
10 113,7	0,000 004	3,67	19 000 000
11 444,4	0,000 003 6	3,33	23 280 000
10 875,0	0,000 000 8	3,89	62 930 000
25,000	0,000 000 36	4,12	134 340 000

Auffällig ist der relativ übereinstimmende Eisengehalt bei den verschiedenen Präparaten, obgleich dieselben auf ziemlich getrennten Wegen erhalten wurden.

Die berechneten Umsätze in der letzten Kolumne stellen betreffs der Größe eine gute Illustration über die erreichten Aktivitäten der besten Präparate dar. Dieselben übertreffen *Warburgs* entsprechende Zahlen um einige hundert Male. Da sich der absolute Umsatz auf diese Dimensionen beläuft, verschwindet hierbei das Verhältnis zwischen zugesetzter Enzymmenge und entsprechend zugesetzter Eisenmenge, weshalb diese Ziffern, wie es bei *Willstätter* der Fall ist, weder für noch gegen die Annahme des Eisens als einziger aktiver Gruppe im Enzym Katalase sprechen.

Willstätter und *Stoll* gelangen in der ersten Abhandlung über Peroxydase zu recht hohen Eisengehalten. Wenn auch der Eisengehalt mit dem Reinheitsgrad steigt, lassen die Verfasser doch die Frage des Eisens als die aktive Gruppe offen, da der Umsatz, auf das vorhandene Eisen gerechnet, unwahrscheinlich groß zu werden scheint. Die Verfasser schreiben über diesen Umstand wie folgt[1]:

„Unter der Voraussetzung, organisch gebundenes Eisen sei der Träger der peroxydatischen Wirkung, treffen bei einem Präparate von der Purpurogallinzahl 700 und dem Eisengehalt 0,5 Proz. bei einer Hydroperoxydkonzentration von 1 : 40000 in 5 Minuten auf 1 mg Fe an gebildetem Purpurogallin 140000 mg. Nimmt man an, die Bildung des Purpurogallins ($C_{11}H_8O_5$) erfordere 2½ bis 3 Mole Hydroperoxyd, so würden auf 1 At. Fe in einer Sekunde 297 bis 355 Mole Hydroperoxyd umgesetzt werden. Das ist ein außerordentlich hoher Wert für

[1]) *Willstätter* und *Stoll*, Liebigs Ann. **416**, 62, 1918.

die Umsetzungsgeschwindigkeit, namentlich in Anbetracht der geringen Konzentration des Hydroperoxyds und der komplizierten Oxydationsreaktion. Diese Betrachtung macht den stöchiometrischen Anteil des Eisens sehr unwahrscheinlich."

In seiner späteren Abhandlung findet *Willstätter* bedeutend weniger Eisen in Präparaten mit höherer Peroxydasewirkung.

Berechnet man die Aktivität bei meinem besten Präparat in der obenstehenden Tabelle XIX nach *Willstätters* Prinzip, so erhält man

$$186{,}05 \text{ Mol. } H_2O_2/\text{Atm. Fe . Sekunde.}$$

Da der Eisengehalt im vorliegenden Präparat bis zu 4,12 Proz. beträgt, darf ein Umsatz von den oben angegebenen Dimensionen als wahrscheinlich angesehen werden können. Auch wenn die aktive Gruppe der Katalase aus etwas anderem als Eisen bestehen würde, werden die auf diese Gruppe gerechneten Umsätze eine entsprechende Höhe erreichen.

IIIb. Versuche über die Inaktivierung mit Salzsäure und Abdialysierung von eventuell gebildetem Eisenchlorid.

Um zu ergründen, ob die Katalase, soweit sie eine Eisenverbindung ist, mit Säuren gespalten und dann durch Zusatz von neuem Eisen regeneriert werden kann, wurde folgender Versuch ausgeführt:

5 ccm Enzymlösung, Kat.f. = 8500,0, mit dem Gehalt von 0,00045 g Trockensubstanz wurden 0,5 ccm 0,1 n HCl zugesetzt. Hierbei verschwanden 97,6 Proz. der Aktivität. Nach der Dialyse konnte jedoch auch bei Anwesenheit von Eisensalzen keine Regeneration der Aktivität vermerkt werden. Die Salzsäure kann aber eine zu starke Einwirkung auf die aktiven Gruppen des Enzyms ausgeübt haben, um die Wiederherstellung der Aktivität zu ermöglichen.

IIIc. Das Verhalten des Enzyms Katalase zu Eisensalzen.

In meiner ersten Veröffentlichung beschäftigte ich mich etwas mit dem Verhalten des Enzyms zu Eisensalzen, und zwar um eine Aktivierung mit denselben sowie mit Mangansalzen zu bewirken. Zu diesem Zeitpunkt waren mir die Arbeiten, die *G. Lockemann, Thies, Wichern*[1]), *Farve*[2]) und *Santesson*[3]) ausgeführt haben, noch nicht bekannt.

[1]) *G. Lockemann, Thies, Wichern,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 390, 1909.

[2]) *Farve,* diese Zeitschr. **33**, 32, 1911.

[3]) *Santesson,* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **59**, suppl., **469**, 1908; Skand. Arch. f. Physiol. **23**, 99, 1909; **32**, 405, 1915; **33**, 97, 1916; **39**, 132, 1920; **39**, 236, 1920; **42**, 129, 1922; **44**, 262, 1923.

Farve faßt die Resultate *Lockemanns*, *Thiers* und *Wicherns* folgendermaßen zusammen:

„Erstens: Die hemmende Wirkung der Eisensalze äußert sich je nach der zur Katalaselösung hinzugefügten Menge dieser Salze in eigenartiger Gesetzmäßigkeit. Bei Vergrößerung der Menge wächst auch die hemmende Wirkung auf das Ferment fast bis zur vollkommenen Inaktivierung desselben. Setzt man zu solch einer Mischung Wasserstoffsuperoxyd, so wird dasselbe nur in sehr geringer Menge zersetzt. Darauf äußert sich bei weiterer Erhöhung des Eisengehalts wiederum die katalytische Wirkung in wachsender Intensität.

Zweitens: Diese Erscheinung ist um so bemerkenswerter, als diese Eisensalze an und für sich katalytische Fähigkeit besitzen und man glauben sollte, daß zwei Katalysatoren — das Eisensalz und die Katalase — in einer Mischung den Effekt erhöhen müßten; allein sie wirken hemmend aufeinander."

„Die Oxydsalze wirkten bei gleicher Eisenkonzentration im Versuch stärker katalytisch und hemmten die Katalase stärker als die Oxydulsalze."

Farve und *Santesson* machten ähnliche Erfahrungen. Ferner hat *Wieland* in einer kürzlich erschienenen Abhandlung[1]) die Aktivität der Eisen-Ammoniak-Alaunlösung gegenüber H_2O_2 studiert, sowie das Verhalten der Reaktion zur Blausäure, worauf ich im nächsten Kapitel zurückkommen werde.

Spring[2]), der Entdecker der beschriebenen Aktivität der Eisensalze, schreibt dieselbe dem durch Hydrolyse gebildeten Hydrat zu. *Bredig*[3]) sieht dagegen die Bildung einer Verbindung zwischen H_2O_2 und Eisen bzw. Eisenhydrat als das Prinzip der Tätigkeit an.

Duclaux[4]) wiederum schreibt die Aktivität den nicht hydrolysierten Eisenionen zu. *Manchot*[5]) hat sich über die Bedeutung des Eisens bei den Oxydationsprozessen orientiert. *Wieland* schließt sich *Bredigs* Auffassung an.

Die Frage ließe sich untersuchen, wenn der Grad der Hydrolyse und die Aktivität bei verschiedenen p_H bestimmt würde, das Wahrscheinlichste ist aber wohl die Bildung einer Verbindung in vollständiger Analogie mit den Enzymreaktionen und anderen Katalysereaktionen wie die Hydrolyse von Estern[6]).

IVa. HCN-Vergiftung der hochaktiven Präparate.

Das Verhalten des Enzyms Katalase zur Blausäure ist von mehreren Forschern behandelt worden, so unter anderen von *Senter*[7]), *Rona*, *Fiegel* und *Nakahara*[8]) und zuletzt von *Wieland*.

[1]) *Wieland*, Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge IX. Liebigs Ann. **445**, 181, 1925.

[2]) *Spring*, Bull. de l'Acad. roy. d. Sc. de Belg. (3) **30**, 32, 1895.

[3]) *Bredig*, Zeitschr. f. physik. Chem. **31**, 279f., 1899.

[4]) *Duclaux*, C. r. de l'Acad. d. Sc. **145**, 802, 1907.

[5]) *Manchot* und *Herzog*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **27**, 397, 1901; *Manchot* und *Wilhelms*, Ber. d. d. chem. Ges. **34**, 2479, 1901; *Manchot*, Liebigs Ann. **325**, 93, 1902.

[6]) *K. G. Karlsson*, Inaug.-Diss. Stockholm 1925.

[7]) *Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 257, 1903; **51**, 673, 1905.

[8]) *Rona*, *Fiegel* und *Nakahara*, diese Zeitschr. **160**, 272, 1925.

Das gesamte Problem betreffs des Einflusses der Stoffe auf die Katalasewirkung muß jedoch von einem neuen Gesichtspunkt aus erforscht werden, nämlich hinsichtlich des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration auf die Salzwirkung. Die Beachtung der Acidität bei Vergiftungsversuchen wurde durch die Versuche *von Eulers* und *Myrbäcks*[1]) von großer Bedeutung.

Die Frage des Verhaltens der Blausäure zur Katalase wurde wieder aktuell, nachdem, wie in der Einleitung hervorgehoben, *Warburg* beim Aufstellen seiner Oxydationstheorie HCN als *spezifischen* Vergifter aller Katalysatoren zu Oxydationsprozessen hinstellt. Hierbei muß man wieder auf das sehr verschiedenartige Verhalten des Enzyms in vivo und in vitro Rücksicht nehmen. Nach *Dunker* und *Jodlbauer*[2]) ist die Empfindlichkeit für Blausäure im ersteren Falle bedeutend geringer als im letzteren.

Alle Versuche, durch Vergiftung der Katalase eine Anhäufung von H_2O_2 in irgendeinem Gewebe zu bewirken, scheinen mißglückt zu sein; dies kann jedoch die Theorie, H_2O_2 sei ein intermediäres Produkt bei der Oxydation, ebensowenig abschwächen, wie der Umstand, daß man Formaldehyd als erstes Produkt bei der Assimilation nicht hat nachweisen können, die diesbezügliche Theorie anzugreifen nicht imstande ist.

Mc Leod und *Gordon*[3]) haben dagegen ermittelt, daß (anaerobe) Pneumokokken, welche von Katalase frei waren, H_2O_2 bei Anwesenheit von Sauerstoff bilden.

Auf diesem Gebiete hat ferner *Warburg*[4]) eine kleinere Untersuchung gemacht.

Der Reinheitsgrad eines Enzyms ist natürlich von allergrößter Bedeutung für das Resultat einer Vergiftungsuntersuchung, und im allgemeinen sieht man die Reversibilität und zeitliche Unveränderlichkeit der Vergiftung als die Kriterien eines hohen Reinheitsgrades an, ebenso wie es selbstverständlich ist, daß die Menge des Vergifters in angemessenem Verhältnis zur Enzymmenge steht. *Senter*[5]) war der erste, welcher eine Größenordnung der Vergiftung für Blutkatalase aufstellte. Die folgende Tabelle gibt die Ziffern hierüber in bearbeiteter Form wieder.

---

[1]) *von Euler* und *Myrbäck*, Svensk. kemisk tidskrift, Dec. 1922; Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**, 297, 1923; *Myrbäck*, Svenska Vet. ak. ark. 8, Nr. 29 und 32.

[2]) *Dunker* und *Jodlbauer*, diese Zeitschr. **33**, 253, 1911.

[3]) *Mc Leod* und *Gordon*, Biochem. Journ. **16**, 499, 1922; Journ. of Path. and Bact. **26**, 332, 1923; **28**, 155, 1925.

[4]) *Warburg* und *T. Uyesugi*, diese Zeitschr. **146**, 486, 1924.

[5]) *Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 307, 1903.

n . 10^{-6} HCN X_1	Erforderliche Zeit für einen 50proz. Umsatz Minuten	Vergiftungsgrad Y_1 Proz.	n . 10^{-6} HCN X_1	Erforderliche Zeit für einen 50proz. Umsatz Minuten	Vergiftungsgrad Y_1 Proz.
—	40	—	10	111	63,96
4	65	38,46	20	188	78,72

Eine ähnliche Untersuchung mit Hämaselösung ergab[1]):

n . 10^{-6} HCN X_2	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrad Y_2 Proz.	n . 10^{-6} HCN X_2	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrad Y_2 Proz.
—	0,0173	—	2,0	0,0062	64,16
0,8	0,0119	31,21	4,0	0,0040	76,88

Es folgt ferner ein Referat über *Ikedas* Untersuchung über die entsprechende Empfindlichkeit der Platinkatalyse[2]).

n . 10^{-6} HCN X_3	Erforderliche Zeit für einen 50proz. Umsatz Minuten	Vergiftungsgrad Y_3 Proz.
—	7,5	—
0,05	15,4	51,30
4,00	22,0	65,91

Die Tabelle veranschaulicht, daß der Vergiftungsgrad von der Reinheit des Enzyms abhängig ist; in welchem Grade dies der Fall ist, geht aus den Versuchen nicht hervor, da die Aktivitäten unbekannt sind. Bemerkenswert ist ferner, daß die Empfindlichkeit des Platins um so viel stärker ist als die des Enzyms (s. Abb. 1 auf S. 350).

Außerdem stellt *Senter* die Vergiftung bei Durchlüftung einer Mischung von Enzym und Blausäure als reversibel fest. Dieses habe ich bei meinen Präparaten gleichfalls konstatiert.

10 ccm Enzymlösung, Kat.f. rund 8000, welche 1 : 3 $K = 0{,}0340$ ergab, wurden mit 10 ccm HCN-Lösung und 10 ccm Phosphatpuffer $p_H = 6{,}80$ gemischt.

Von dieser Lösung erhielt ich hierbei $K = 0{,}0059$, nach 2 Stunden Durchlüftung $K = 0{,}0152$ und nach $3\frac{1}{4}$ Stunden Durchlüftung $K = 0{,}0339$, also volle Regeneration[3]).

Wieland weist dagegen in seiner letzten Abhandlung das entgegengesetzte Resultat nach, er führt diesen Umstand jedoch auf eine andere

---

[1]) *Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. 44, 309, 1903.
[2]) Zeitschr. f. physik. Chem. 44, 310, 1903.
[3]) HCN bestimmte ich nach *Volhard*. Es wurden jede Woche neue Lösungen bereitet, da die Giftwirkung derselben mit der Zeit abnimmt.

Ursache zurück, nämlich die, daß das Enzym in der zur Anwendung kommenden, starken Verdünnung schon allein durch die Schüttelung, die der Luftstrom bewirkt, inaktiviert wird.

Nebenbei konstatierte er, daß die Giftwirkung geringer wird, wenn man einer bestimmten Enzymlösung HCN-Lösung zusetzt und man dann entweder vor oder nach der Inkubationszeit mit H_2O verdünnt.

Wieland zieht hieraus den Schluß, daß die Blausäurevergiftung der Katalase ausschließlich eine Adsorptionserscheinung ist.

Die Grenze zwischen Adsorptionsverbindung und chemischer Verbindung ist bekanntlich dehnbar. *H. von Euler* äußert sich in dieser Angelegenheit wie folgt:

„Die Adsorption ist im Wesentlichen ein *chemischer* Vorgang, d. h. er wird durch die allgemein gültigen chemischen Gleichgewichtskonstanten und durch die Lösungstensionen (Zersetzungsspannungen) im Sinne der *Nernst*schen Theorie geregelt[1]."

Warburg erklärt ebenfalls, daß die Vergiftung von Oxydationsprozessen mit Blausäure nicht durch die Bildung einer chemischen Verbindung zwischen Eisen und Blausäure bedingt ist, sondern durch eine losere adsorptive Verbindung.

Die Abhängigkeit von der Verdünnung, die *Wieland* bei der genannten Vergiftung konstatierte, kann bei der Annahme, daß die Inaktivierung durch chemische Bindung zustande kommt, auf Hydrolyse dieser Verbindung zwischen Vergifter und Enzym zurückgeführt werden, weshalb sich jeder Gedanke an losere adsorptive Bindungen erübrigt. Dasselbe Phänomen liegt ja auch bei der Spaltung von H_2O_2 mit Eisensalzen und der Vergiftung dieses Katalysators mit Blausäure vor. *Senter* machte ferner die Erfahrung, daß die Blausäurevergiftung von der Inkubationszeit abhängig ist. Wurde H_2O_2 mit HCN gemischt und Blutlösung zugesetzt, so war weniger Zeit für 50 Proz. Umsatz erforderlich, als wenn man HCN und Blut mischte und die Mischung nach ½ Stunde auf ebendieselbe Menge H_2O_2 einwirken ließ.

Meine eigenen Enzymlösungen weisen dieselbe Eigenschaft auf, jedoch in bedeutend geringerem Grade.

Die obige Enzymlösung, welche 1 : 3 $K = 0{,}0340$ ergab, wurde in gleichem Grade, aber mit derselben Menge HCN-Lösung verdünnt. Sie ergab hierbei $K = 0{,}0059$. Das Enzym hatte somit eine Vergiftung von 82,65 Proz. erfahren. Aus der Tabelle XX ist ersichtlich, daß eine Regeneration der Aktivität mit der Zeit nicht vor sich geht, sondern daß sich im Gegenteil ein langsames Abnehmen derselben geltend macht. Ebensowenig konnte eine Aktivität durch Zusatz von Eisen-

---

[1]) *H. von Euler*, Chemie der Enzyme 1, 85.

salzen zur Lösung bewirkt werden, was ebenfalls aus dem in der Tabelle XX aufgezeichneten Versuch hervorgeht.

Tabelle XX.

Zeit nach Herstellung der Mischung Stunden	Reaktionskonstante	Anmerkungen
0	0,0059	
4	0,0054	
22	0,0046	Mit 0,000 003 58 n $FeCl_3$, $K = 0{,}0048$
27	0,0042	

Rona, *Fiegel* und *Nakahara* (l. c.) konstatieren dagegen die Vergiftung während des Verlaufs der Reaktion als reversibel.

IVb. Die Abhängigkeit des Vergiftungsgrades von der Aktivität und dem Eisengehalt bei hochaktiven Katalasepräparaten.

Die ursprüngliche Lösung für die erste Adsorption in Tabelle XVIIIa auf S. 336 hatte anfangs eine Aktivität von 862,6. Eine Serie von Vergiftungsversuchen hiermit ergab folgendes Resultat:

Tabelle XXI.

Kat.f. = 862,6.

n. 10^{-6} HCN	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrad Proz.	n. 10^{-6} HCN	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrad Proz.
—	0,0424	—	4,557	0,0153	63,92
1,519	0,0263	37,97	6,076	0,0102	75,94
3,038	0,0184	56,60			

Am nächsten Tage war etwas von der Trockensubstanz gefällt, nach Abfiltrieren derselben zeigte es sich, daß die Aktivität auf 1137,8 gestiegen war, und daß sich damit die Empfindlichkeit für HCN verändert hatte.

Tabelle XXII.

Kat.f. = 1137,8.

n. 10^{-6} HCN	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrad Proz.	n. 10^{-6} HCN	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrad Proz.
—	0,0219	—	4,557	0,0056	74,43
1,519	0,0115	47,49	6,076	0,0039	82,19
3,038	0,0087	60,27			

Unmittelbar nach der später vorgenommenen Kaolinadsorption und Elution wurde eine neue Serie von Versuchen vorgenommen, die ergaben, daß die Empfindlichkeit weiter gesteigert war.

Tabelle XXIII.

Nach der Elution.

n . 10^{-6} HCN	Reaktions-konstante	Vergiftungsgrad Proz.	n . 10^{-6} HCN	Reaktions-konstante	Vergiftungsgrad Proz.
—	0,0338	—	1,1392	0,0168	50,30
0,3797	0,0296	12,43	3,0380	0,0035	89,64
0,7595	0,0255	24,56			

Nach der Dialyse, während welcher die Aktivität der Tabelle gemäß um 25,0 Proz. sank, wurde die Beobachtung gemacht, daß auch der Vergiftungsgrad gesunken war. Dies dürfte sich folgendermaßen erklären lassen, nämlich in der Annahme, die Vergiftung komme durch chemische Bindung der aktiven Gruppe und der Blausäure zustande, diese Gruppe, auch nach der Inaktivierung, fortgesetzt HCN bindet und somit für denselben prozentualen Vergiftungsgrad eine größere Menge HCN erforderlich ist.

Die Vergiftungsserie für die dialysierte Enzymlösung erhielt folgendes Aussehen:

Tabelle XXIV.

Kat.f. = 8086,0.

n . 10^{-6} HCN	Reaktions-konstante	Vergiftungsgrad Proz.	n . 10^{-6} HCN	Reaktions-konstante	Vergiftungsgrad Proz.
—	0,0345	—	1,9288	0,0132	61,74
0,4822	0,0338	2,03	4,8220	0,0063	81,74

Das beifolgende Diagramm (Abb. 2) enthält die Kurven für die verschiedenen Vergiftungen der diesbezüglichen Enzympräparate.

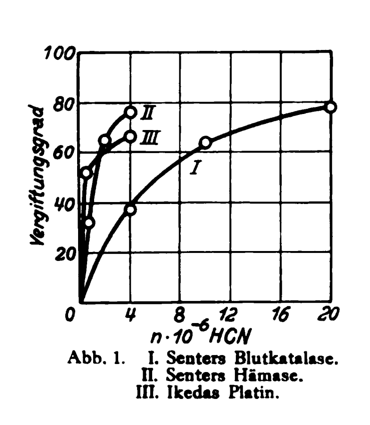


Abb. 1. I. Senters Blutkatalase.
II. Senters Hämase.
III. Ikedas Platin.

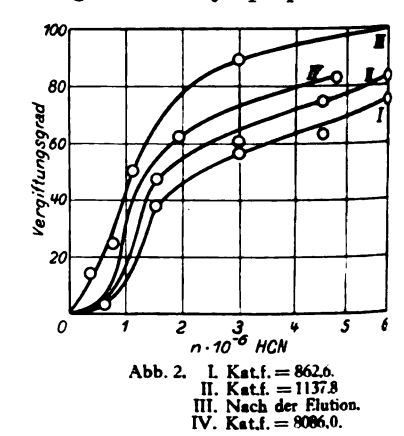


Abb. 2. I. Kat.f. = 862,6.
II. Kat.f. = 1137,8
III. Nach der Elution.
IV. Kat.f. = 8086,0.

Eine ähnliche Vergiftungsuntersuchung mit den anderen Adsorptionslösungen ergab folgende Zahlen:

Tabelle XXV.

n.10⁻⁶ HCN	Reaktions-konstante	Vergiftungsgrad Proz.	n.10⁻⁶ HCN	Reaktions-konstante	Vergiftungsgrad Proz.
I. Ursprüngliche Lösung, Kat.f. = 1365,0.					
—	0,0435	—	4,822	0,0086	80,23
0,9644	0,0270	37,93	12,055	0,0018	95,86
1,9288	0,0175	59,77			
II. Nach Adsorption und Elution.					
—	0,0388	—	0,4822	0,0117	69,85
0,2440	0,0251	35,31	0,9644	0,0019	95,10
III. Die dialysierte Lösung, Kat.f. = 22 250,0.					
—	0,0534	—	0,9644	0,0247	53,75
0,4822	0,0327	38,76	4,8220	0,0065	87,83

Abb. 3. I. Kat.f. = 1365,0; II. Nach der Elution; III. Kat.f. = 22250,0.

Der Vergiftungsgrad ist somit in keinem höheren Maße von der Aktivität abhängig. Es ergab sich ferner, daß die Empfindlichkeit meiner Präparate gegenüber Blausäure kaum viel größer ist als z. B. diejenige der Präparate *Senters*, obwohl die letztgenannten eine bedeutend geringere Aktivität aufweisen.

Das Verhältnis zwischen den Eisengehalten im Ausgangs- und Endpräparat ist nach meinen Ausführungen 1 : 1,55. Die Aktivierung betrug im ersten Falle 1 : 9,37. Die Reaktionskonstante belief sich auf 0,0424 im ersteren Falle und 0,0345 in der Endlösung. Die Verhältnisse der Eisenmengen zueinander sind somit:

$$\frac{1}{1{,}55}\,\frac{0{,}0424}{0{,}0345}\cdot 9{,}37 = 7{,}43.$$

Bei der ersten Lösung ist 40 Proz. Vergiftung in etwa $1{,}6 \,.\, 10^{-6}$ n HCN und bei der letzten in etwa $1{,}0 \,.\, 10^{-6}$ n HCN eingetreten. Die Blausäuremengen verhalten sich somit zueinander wie 1 : 1,6.

Im letzten Versuch verhalten sich die Eisenmengen wie 1 : 8,57 und die Normalitäten Blausäure für 40 Proz. Vergiftung waren $1{,}0 \,.\, 10^{-6}$ und $0{,}5 \,.\, 10^{-6}$.

Die höchstaktive der obengenannten Enzymlösungen enthielt 0,0006 g Trockensubstanz auf 10 ccm und ergab 1 : 25 $K = 0{,}0534$, hieraus Kat.f. $= 22250{,}0$. Zu 50 ccm Reaktionsmischung wurden also $2{,}4 . 10^{-6}$ g Trockensubstanz oder $8{,}81 . 10^{-8}$ g Eisen verwendet. Zur 50 proz. Vergiftung dieser Menge war 10^{-6} n HCN nötig $= 1{,}351 . 10^{-6}$ g. Die Größenordnung der Gewichtsmenge ist also für Enzym und Blausäure ungefähr die gleiche.

Für den *Warburg*schen Satz, daß die Wirkung der Blausäure in der Bindung des katalytisch wirkenden Eisens besteht, bilden die hier beschriebenen Versuche über Katalase jedenfalls keine Stütze.

V. Vergleichende Oxydationsversuche mit Alanin und Kohle als Katalysator.

Nachdem *Ehrlich* die nach ihm benannte Aminosäuregärung entdeckt hatte, bei welcher die Aminosäuren Kohlensäure und Ammoniak unter Bildung von Alkoholen mit der nächstniedrigen Anzahl von Kohlenatomen abspalten, zeigte eine Serie Untersuchungen [1]), daß dasselbe Substrat beim Stoffwechsel in den Organen der Säugetiere Fettsäuren mit einem Atom Kohle weniger liefert. Dies ist also ein rein oxydativer Prozeß.

O. Neubauer und *Fromherz* [2]) haben sich deshalb den experimentellen Beweis zur Aufgabe gemacht, daß ein und derselbe Ingreß in beiden Fällen vorliegt, nämlich die intermediäre Bildung der der Aminosäure entsprechenden Ketonsäure. Bei der Gärung mit anwesender Phenylaminoessigsäure gelang es diesen Forschern, auch Phenylglyoxylsäure, Benzylalkohol, l-Mandelsäure und l-Acetylphenylaminosäure als Produkte zu entwickeln. Benzaldehyd konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Die Bildung von Kohlensäure aus der entsprechenden Aminosäure geht also in zwei Prozeduren vor sich: Ammoniakabspaltung und Oxydation, und *Neubauer* veranschaulicht, daß die letztgenannte der ersteren unter gleichzeitiger intermediärer Bildung des Hydrats zur Aminosäure nach folgendem Schema vorausgeht:

$$\begin{array}{c}C_6H_5\\ |\\ C\!\left\langle\begin{array}{l}H\\ NH_2\end{array}\right.\\ |\\ CO_2H\end{array} + O = \begin{array}{c}C_6H_5\\ |\\ C\!\left\langle\begin{array}{l}OH\\ NH_2\end{array}\right.\\ |\\ CO_2H\end{array} = \begin{array}{c}C_6H_5\\ |\\ CO\\ |\\ CO_2H\end{array} + NH_3$$

Eine weitere Stütze für diese Auffassung erblickt *Neubauer* in dem Umstand, daß p-Oxyphenylpyrotraubensäure vergärbar ist. Dieser Prozeß setzt sich aus Kohlensäureabspaltung und Reduktion zusammen, und da diese Reaktionen in der soeben genannten Ordnung einzutreten scheinen, stellt also Aldehyd das Zwischenprodukt dar.

Neubauer vergleicht darauf den Abbau der Aminosäuren einerseits mit Hilfe von Hefe, andererseits mit Hilfe von organischem Gewebe von höherstehenden Tieren, und behauptet, daß der Reaktionsmechanismus völlig analog ist. Der Unterschied besteht nur darin, daß Hefe ihren gebildeten Aldehyd reduziert, während tierisches Gewebe ihn über die entsprechende Säure weiter oxydiert.

---

[1]) Literatur bei *O. Neubauer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **95**, 211, 1909.

[2]) *Neubauer* und *Fromherz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 326, 1910/11.

In beiden Fällen führen die Nebenreaktionen zu Alkoholsäuren und acetylierten Aminosäuren.

Fromherz hat in einer späteren Abhandlung[1]) über Fütterungsversuche an Hunden in allen wesentlichen Teilen *Neubauers* oben angeführtes Umsatzschema bestätigt.

In seinen drei letzten Abhandlungen „Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge VII, VIII und IX" widmet sich *Wieland*[2]) dem Studium der Oxydation der Aminosäuren.

Eine zentrale Rolle bei dem biologischen Abbau im Organismus wurde der Brenztraubensäure zugeschrieben. Teils ist sie nach *Embdens* Untersuchungen ein Zwischenglied bei der Oxydation des Kohlehydrats zu Milchsäure, teils bildet sie sich über die Fumarsäure-Apfelsäure-Oxalessigsäure aus Bernsteinsäure, welch letztere ein wichtiges Zwischenprodukt bei dem allgemeinen Stoffwechsel darstellt.

Ferner wird Brenztraubensäure teils durch Desaminierung von Alanin und teils aus Asparaginsäure über Oxalessigsäure gebildet.

Als nächstes Gliedim Stoffwechsel hat *C. Neuberg* für das Pflanzengewebe das Enzym Carboxylase als Aktivator gefunden, und für animalisches Gewebe befanden *Beth* und *H. von Euler*[3]) dasselbe Enzym als wirksam.

Wieland studierte aus diesem Grunde die decarboxylierende Wirkung näher bei nichtenzymatischen Katalysatoren (Palladiumschwarz und Cellulosekohle) mit Ketonsäuren, wie Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und Phenylbrenztraubensäure als Substrat.

Wieland beobachtete hierbei, daß die Ketonsäuren einer Decarboxylierung mittels der genannten Aktivatoren in nennenswertem Grade nicht unterworfen sind, während dagegen bei Oxalessigsäure Ketonspaltung mit großer Geschwindigkeit hervorgerufen wird. Betreffs des Mechanismus bei der Selbstoxydation hält er die intermediäre Bildung eines Peroxyds für wahrscheinlich.

$$\underset{\overset{\|}{O}}{RC}\text{—COOH} \rightarrow \underset{O\diagdown O \diagup O}{RC}\ \text{COOH} \rightarrow \underset{\overset{\|}{O}}{RCO}.OH + CO_2$$

Es erwies sich, daß die Decarboxylierung der Brenztraubensäure bei der Anwesenheit von Sauerstoff bedeutend schneller vor sich geht, und zwar sowohl bei Versuchen mit Pd als mit Kohle als Katalysator.

In seiner zweiten diesbezüglichen Mitteilung studiert *Wieland* zusammen mit *Bergel*[4]) hauptsächlich die Oxydation von Alanin mit molekularem Sauerstoff und Kohle als Katalysator.

Nach einer kleinen Orientierung über die gebildete Menge Kohlensäure mit wechselnden Mengen Substrat und Katalysator sowie verschiedenen Versuchszeiten diskutieren die Verfasser den Reaktionsverlauf und entdecken, daß zwei Reaktionen nebeneinander verlaufen, nämlich:

$$\text{I. } CH_3\underset{NH_2}{CH}.CO_2H + O = CH_3CHO + CO_2 + NH_3;$$

$$\text{II. } CH_3\underset{NH_2}{CH}CO_2H + O_2 = CH_3CO_2H + CO_2 + NH_3.$$

[1]) *Fromherz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 351, 1910/11.
[2]) *Wieland*, Liebigs Ann. **436**, 229, 1924; **439**, 196, 1924; **445**, 181, 1925.
[3]) *Beth* und *H. von Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**, 311, 1916.
[4]) *Wieland* und *Bergel*, Liebigs Ann. **439**, 196, 1924.

Bei zwei Versuchen wurde eine vollständige Analyse der Reaktionsprodukte vorgenommen, wobei die Bildung nach obigen Formeln als sicher festgestellt wurde. Nach Ausblasen der Kohlensäure in ein abgemessenes Volumen titrierter Barytlösung wurde die zurückbleibende Reaktionsmischung nach Zusatz von Phosphorsäure destilliert und darauf die Essigsäure und der Acetaldehyd im Destillat acidimetrisch bzw. jodometrisch bestimmt. Die Methodik ist zwar nicht besonders genau. Die Kohlensäure verläßt die Reaktionsmischung beim Ausblasen sicherlich nicht vollständig, und hierbei treten bestimmt Verluste sowohl an Aldehyd als auch Essigsäure ein. Ebenfalls können bei der Destillation Verluste an diesen beiden letztgenannten Produkten eintreten. Nach der Beobachtung dieser Verfasser hält die Kohle große Mengen an Reaktionsprodukten durch Adsorption gebunden. Es scheint also recht schwer zu sein, eine unanfechtbare Versuchsmethode herauszufinden.

Bei näherem Stadium der Reaktion erwies es sich, daß dieselbe, wie so oft, in verschiedenen Phasen verläuft. Vieles spricht für die Bildung von Iminosäure als intermediäres Produkt in Übereinstimmung mit folgender Formel:

$$CH_3\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{C}}HCOOH + O = CH_3\underset{\displaystyle NH}{\underset{\|}{C}}.COOH + H_2O \rightarrow CH_3\underset{\displaystyle NH}{\underset{\|}{C}}H + CO_2$$

$$\xrightarrow{+H_2O} CH_3CHO + NH_3$$

Die Decarboxylierung geht der Desamidierung voraus, denn aus Brenztraubensäure wird nicht Aldehyd, sondern Essigsäure gebildet. Die Bildung der Säure kommt dagegen über die Ketonsäure zustande.

Eine vollständige Oxydation liegt somit nicht vor, und selbst wenn man mit den oben angeführten Formeln rechnet, erhält man nur Ausbeuten an Kohlensäure von 6 bis 8 Proz. und Essigsäure- und Aldehydmengen, welche 35 bis 40 Proz. derjenigen Quantitäten betragen, die den Kohlensäuremengen entsprechen.

Mit Asparagin erzielt man bedeutend bessere Ausbeuten.

In seiner letzten Abhandlung[1]) liefert *Wieland* außer einer Studie über die Leberkatalase und deren Vergiftung einen Beitrag zur Kenntnis der Einwirkung des Wasserstoffperoxyds auf organische Carbonsäuren, der jedoch kein unmittelbares Interesse für die Problemstellung in meiner vorliegenden Abhandlung erweckt.

Warburg gründet, wie früher in der Einleitung hervorgehoben, seine Oxydationstheorie auf Experimente über die Oxydation der Aminosäuren mittels molekularen Sauerstoffs, wobei Kohle und organisches Gewebe die Vermittler sind. Er arbeitet anfangs mit Cystin, was man leicht durch Kochen von Eiweiß mit starker Salzsäure erhalten kann. Als Oxydationskatalysator wendet er *Mercks* Tierblutkohle an. Für jeden Versuch werden etwa 1 g Kohle und 100 ccm 0,034 proz. Cystinlösung benutzt[2]). Hierauf wird die Kohlesuspension mit einem größeren Volumen Sauerstoff in Berührung gebracht und im Thermo-

[1]) *Wieland*, Liebigs Ann. **445**, 181, 1924.

[2]) Dieses gilt für die Adsorptions- und Ausbeuteversuche. Beim Studium der Kinetik kommen bedeutend kleinere Mengen zur Anwendung.

staten geschüttelt. Da das Volumen des aufgenommenen Sauerstoffs demjenigen der abgegebenen Kohlensäure nicht gleich ist, kann man dem Verlauf der Reaktion dadurch folgen, indem man die Druckänderung mit Hilfe von *Haldane-Barcrofts* Blutgasmanometer studiert. Später führt *Warburg* parallele Versuche aus, und zwar wird in dem einen dieser Versuche die gebildete Kohlensäure durch Einführung von Kalilauge in den Versuchskolben absorbiert.

Die Produkte dieser Oxydation sind nach *Warburg* dieselben wie in Organen; Kohle wird zu Kohlensäure oxydiert, Wasserstoff gibt Wasser, Schwefel Schwefelsäure, und aus Stickstoff wird Ammoniak gebildet. Die Reaktion ist jedoch niemals vollständig. Die Reaktionsgeschwindigkeit stieg mit dem Sauerstoffdruck bis auf ein Maximum. Nach der Reaktion kann Cystin nicht nachgewiesen werden. Wird Cystin aufs neue zugeführt, beginnt die Reaktion mit ihrer Anfangsgeschwindigkeit.

Die Reaktion wurde ferner als monomolekular befunden, wenn man mit dem Grenzwert als A in der Formel rechnet.

Durch Temperatursteigerung wird teils die Adsorptionsgeschwindigkeit für den Sauerstoff erhöht und teils der Endwert verändert.

Ferner hat jede Kohlensorte ihre eigene Aktivität.

Es gelang *Warburg*, auf diese Weise andere Eiweißstoffe, wie Tyrosin und Leucin, zu oxydieren, dagegen nicht Zucker, Fettsäuren, Milchsäure oder Apfelsäure.

Daß Glukose nicht oxydiert, ist um so bemerkenswerter, da dieser Stoff leicht oxydiert mit Alkalien, Kupfersalzen und kolloidalem Palladium.

Kohle im gleichen Gewicht mit einer $1{,}7 \cdot 10^{-3}$ mol. Cystinlösung besitzt dieselbe Aktivität wie lebendes Gewebe.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß Oberflächenkräfte chemische Reaktionen in Gasen katalysieren können. So beschleunigen z. B. Porzellan, Quarz und andere feste Körper die Knallgasreaktion. Dieselbe Regel gilt für das obengenannte System in Lösung.

Die Aminosäuren und der Sauerstoff werden durch Adsorption an Kohle aktiviert. Führt man der Lösung noch einen Stoff zu, so wird dieser mit dem Cystin um den Adsorptionsraum an der Kohle konkurrieren, und die Oxydation wird in solchem Grade gehemmt werden, als es dem neu zugeführten Stoff gelingt, das Cystin zu verdrängen. Es gelang *Warburg*, dieses Verhalten experimentell zu beweisen. Bei Versuchen mit einer Serie von Narkotica wie Uretanen, Ketonen, Nitrilen usw. ergab sich eine gute Parallele zwischen verdrängtem Cystin und Oxydationshemmung.

Nun besitzen wir aber in HCN ein spezifisches Gift für die Oxydation. Mit Blausäure trat Hemmung bereits in so stark verdünnten Lösungen wie 1 : 1000 bis 1 : 10000 mol. ein, während es 1 bis 1 : 10 mol.

HCN bedarf, um eine Adsorptionsverdrängung entsprechend dem Vergiftungsgrad in den erstgenannten Lösungen hervorzurufen. HCN wirkt also durch elektive Verdrängung.

Als Erklärung für die Vergiftung stellt sich dieser Verfasser vor, daß es in der Kohle aktive und inaktive Regionen gibt. Die aktiven Regionen bestehen aus schweren Metallen, besonders Eisen, in irgendeiner stickstoffhaltigen, organischen Verbindung. Wenn die Oxydation in der Hauptsache zu den Eisenregionen hin lokalisiert ist, erklärt es sich leicht, daß so kleine HCN-Quantitäten erforderlich sind, um dieselbe zu inaktivieren. Der Verfasser meint hierbei nicht, daß Eisen und Blausäure eine chemische Verbindung eingehen, sondern daß HCN vom Eisen adsorbiert wird.

Mercks Blutkohle enthält pro Gramm Kohle 5 Millionstel Mol. Fe und 3 Millionstel mol. Cu. Um deren Wirkung zu hemmen, bedarf es 10 Millionstel mol. HCN, also eine Quantität gleicher Größenordnung wie die Eisenmenge.

Die Darstellung einer vollkommen eisenfreien Kohle ist praktisch unmöglich. Wenn man Kohle mit konzentrierter HCl extrahiert, um die schweren Metalle auszulösen, so verliert die Kohle infolgedessen an Aktivität, und HCN hemmt die Reaktion bei der eisenarmen Kohle nicht in ebendemselben Grade wie bei der eisenhaltigen.

Kohle aus kristallisiertem Zucker und extrahierte Kohle sind der Autooxydation unterworfen; wogegen Blutkohle dank ihrer Salze geschützt ist.

Kohle aus Benzoesäure enthielt 0,27 Millionstel Mol. Fe pro Gramm Kohle, besaß das gleiche Adsorptionsvermögen wie Blutkohle, jedoch nur ein Drittel der Aktivität derselben. Im allgemeinen verhielt es sich so, daß die Aktivität der verschiedenen Kohlenarten vom Eisengehalt abhängig war, sofern dieser einige Zehntel Milligramm pro Gramm Kohle unterstieg.

Die Kohle selbst besaß der Prüfung gemäß nur den 500. Teil der Aktivität des Eisens.

Werden eisenarme Kohlensorten mit Eisenlösungen getränkt und geglüht, so erhöht sich deren Aktivität; Erhitzung ist hierzu absolut notwendig. Wenn die Eisensalze der Reaktionsmischung nur zugesetzt werden, wird keine Aktivierung bewirkt, sondern im Gegenteil Hemmung, weil das Eisen an die Kohle adsorbiert wird und daher das Cystin teilweise ausschließt. Diese Versuche sind, wie der Verfasser hervorhebt, ein schlagender Beweis dafür, daß Eisen bei dem vorliegenden Oxydationsverlauf eine vorherrschende Rolle spielt, sowie für die Aktivierung der reagierenden Stoffe durch Adsorption. *Warburg* meint, daß der Sauerstoff hierbei an das Eisen und die Aminosäuren an die Kohle adsorbiert werden.

Diese Erfahrungen wendet *Warburg* nunmehr auf das organische Leben an. Eisen ist bekanntlich für das organische Leben ein unentbehrlicher Stoff. Zur Kultivierung von Zellen sind stets eisenhaltige Nährlösungen erforderlich. Die Atmung an Zellen kann man direkt mit der gleichen Methodik studieren, die bei den oben angeführten Oxydationsversuchen zur Anwendung kam. Der Eisengehalt in den Zellen ist sehr klein, vergleichende Versuche zwischen der Atmung von Zellen mit bekanntem Eisengehalt und Oxydationsversuche mit Cystin und Kohle von bekanntem Eisengehalt erklären, daß derselbe groß genug ist, um eine dem Sauerstoffverbrauch entsprechende Oxydation katalysieren zu können.

Im übrigen erhält man vollkommen analoge Verhältnisse. Wird der Eisengehalt in Zellen durch direkten Zusatz von Eisen erhöht, so verstärkt sich auch die Atmungsintensität. Die Bindung des Eisens scheint ziemlich lose zu sein, da ja dessen Katalysewirkung sofort eintritt. Das zugesetzte Eisen hat vollständig die gleiche Aktivität wie das ursprüngliche. Die Aktivität wird hierbei als die auf eine Zeiteinheit verbrauchte Sauerstoffmenge pro Gewichtsmenge Eisen berechnet. Berechnet man das Volumen des Sauerstoffs in Kubikmillimetern, das Eisen in Milligramm und die Zeit in Stunden, so beläuft sich der Wert einer solchen Aktivität von einigen Tausend bis hinauf zu 100000. Die Zellen besitzen pro Gewicht geringeres Adsorptionsvermögen als Kohle, doch besagt dieses Verhalten nichts, da die Größe der wirksamen Flächen nicht bekannt ist.

Narkotica hemmen ebenfalls die Atmung der Zellen im Verhältnis zum Adsorptionsgrad. HCN dagegen hemmt die Atmung bereits in Lösungen von 1 : 10000 bis zu 1 : 100000 n mit einer einzigen Ausnahme (Grünalgen).

HCN scheint darum im allgemeinen, wie *Warburg* hervorhebt, ein kräftiges Gift bei allen denjenigen Reaktionen zu sein, bei denen Sauerstoff frei gemacht oder übergeführt wird, wie bei der Kohlensäureassimilation, Nitratassimilation, Wasserstoffperoxydspaltung und Atmung.

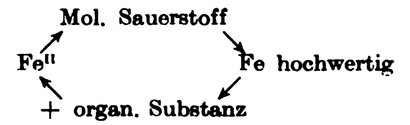
Wenn die Vergiftung auf einer chemischen Bindung beruht, so liegt die Annahme nahe, daß alle diese Reaktionen enzymär von Eisenverbindungen katalysiert werden, und daß sich das Eisen mit HCN verbindet und hierdurch inaktiviert wird.

Es ließe sich möglicherweise denken, führt *Warburg* weiter aus, daß ein autoxydabler Aldehyd der Vermittler der Atmung sein könne, es finden sich aber keine Beweise dafür, daß solche Aldehyde integrierende Bestandteile in lebenden Zellen darstellen.

Ferner wird die Aminosäure durch Adsorption aktiviert, wobei die Zellwände als Adsorbens fungieren.

Läßt man rote Vogelblutzellen bei — 80° gefrieren und dann auftauen, so erhält man eine Flüssigkeit, die sich nach dem Zentrifugieren in zwei Schichten teilt, wobei die untere die Zellwände enthält. Hierbei wurde beobachtet, daß nur diese letztgenannte atmet.

Die Verbrennung in der lebenden Zelle geht in der Grenzschicht zwischen dem flüssigen Zelleninhalt und den festen Strukturteilen vonstatten. An dieser Stelle würde somit das Eisen die Sauerstoffzuführung organischer Stoffe vermitteln, und zwar nach folgendem Schema:



Das erste Glied dieses Ringes, die Aufoxydierung von zweiwertigem Eisen zu hochwertigem, läßt sich leicht verwirklichen. So nehmen gewisse komplexe Eisenverbindungen wie Ferropyrophosphat, Citrat und festes Ferrohydrat, molekularen Sauerstoff unter Oxydation auf. Diese reagieren aber nicht mit organischer Substanz. Nach *Warburg* ist hierzu weiter erforderlich, daß sich das Eisen in einer speziellen Form befindet.

Wie oben hervorgehoben, vermochte die Blutkohle nur Aminosäuren zu oxydieren, dagegen weder Kohlehydrate noch Fette. Betreffs der Kohlehydrate wies *Warburg* nach, daß Fructose in Phosphatlösung mit Spuren von Eisen als Verunreinigung oxydiert.

Hinsichtlich der Fette fand *Thunberg*, daß Eisensalze die Oxydation von Lecithin katalysieren.

Warburg selbst fand, daß Eisensalze die Oxydation der Linolensäure katalysieren, und daß die Wirkung aufhört, sobald die dreifache Bindung in die einfache übergeht.

Im Gegensatz zu diesen Eisenkatalysen entdeckte *Meyerhof*, daß die Sulfhydrylgruppe das Eisen bei der Oxydation von Leinöl ersetzen kann.

Ferner fanden *Mathews* und *Walker*, daß die Autoxydation von Cystin durch HCN gehemmt wird.

Warburg erklärt jedoch, daß diese beiden letztgenannten Reaktionen infolge sehr kleiner Mengen Eisen als Verunreinigungen, ungefähr 1 : 100000 mg Fe, zustandekommen. An eine Sulfhydrylgruppe gebundenes Eisen wies besonders große Aktivität auf.

Hiernach liegt nach *Warburgs* Ansicht kein mit Sicherheit bekanntes Beispiel dafür vor, daß eine Reaktion, die HCN als spezifisches Gift hat, von Katalysatoren verursacht wird, in welchen kein schweres Metall enthalten ist.

Auf diese experimentellen Erfahrungen gestützt, kommt *Warburg* zu seiner oben angeführten Definition des Atmungsenzyms (siehe S. 316).

Die Methodik *Warburgs* bezüglich der Messung des aufgenommenen Sauerstoffgases und der entwickelten Kohlensäure ist vom instrumentalen Gesichtspunkt vollendet. Ein meiner Meinung nach nicht genügend beachteter Umstand liegt jedoch darin, daß die Löslichkeit der entwickelten Gase in der vorhandenen Flüssigkeit nicht konstant, sondern eine Funktion der gebildeten Menge Ammoniak ist. Bei Cystinversuchen spielt dies ja eine untergeordnete Rolle, da gleichzeitig mit Ammoniak Schwefelsäure gebildet wird; nach den Versuchen[1]) ist die Ausbeute an Ammoniak jedoch mehr als doppelt so groß als an H_2SO_4. Bei der Oxydation von Leucin[2]) beträgt die prozentuale Ausbeute an NH_3 74 Proz., dagegen der Sauerstoffverbrauch 16,5 Proz. und die Kohlensäurebildung 17 Proz. des theoretisch Berechneten. Hier muß der oben angeführte Umstand von Einfluß sein.

Der Berechnung der theoretischen Ausbeuten wurde die vollständige Oxydation der Moleküle zu CO_2, H_2O und NH_3, eventuell H_2SO_4 zugrunde gelegt. Die Reaktion ist, wie gesagt, unvollständig, *Warburg*[3]) hat den Reaktionsverlauf jedoch nicht näher studiert und schreibt selbst über diesen Punkt:

„Es ist ein Mangel dieser Untersuchung, daß wir über den Verbleib des Cystins nicht vollständig Rechenschaft ablegen können. Trotzdem haben wir geglaubt, uns in dieser Beziehung bescheiden zu müssen, da eine Entwirrung des Reaktionsverlaufs zweifellos eine schwierige präparative Aufgabe ist, die uns zu weit von unserem eigentlichen Arbeitsgebiet abführen würde. Wir halten es jedoch nicht für ausgeschlossen, daß eine nähere Untersuchung des oxydativen Abbaues von Aminosäuren mittels Kohle in präparativer Hinsicht manches wertvolle Ergebnis zutage fördern wird."

Später kommt derselbe Forscher auf die Frage zurück[4]) und schreibt:

„Aus Leucin entsteht hierbei Ammoniak, Kohlensäure und Valeraldehyd ... neben noch unbekannten Produkten unvollständiger Verbrennung. Wir haben also eine Reaktion zwischen Aminosäuren und Sauerstoff vor uns, bei der, wie bei der Eiweißverbrennung in lebenden Zellen Ammoniak, Kohlensäure und Schwefelsäure erscheinen."

Wunderly[5]) hat kürzlich der Hydrolyse von Aminosäuren mittels Kohle eine Studie mit einer Methodik gewidmet, die sich in wesentlichen Teilen sowohl von derjenigen *Wielands* als auch *Warburgs* unterscheidet.

---

[1]) Diese Zeitschr. **118**, 271.
[2]) Ebendaselbst **118**, 281.
[3]) Ebendaselbst **118**, 272, 1921.
[4]) *Derselbe*, ebendaselbst **152**, 485, 1924.
[5]) *Wunderly*, Zeitschr. f. physik. Chem. **112**, 175, 1924.

Er arbeitet z. B. bei 100° und ohne Sauerstoffatmosphäre. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Bestimmung der gebildeten Menge Ammoniak gemessen.

Von fünf verschiedenen Sorten Kohle wird *Kahlbaums* Knochenkohle als am stärksten aktiv befunden, durch Präparierung mit Eisensalzen geht jedoch der größere Teil ihrer Aktivität verloren. Ferner entdeckte *Wunderly*, daß der Umsatz mit verlängerter Versuchszeit zwar fortschreitet, jedoch einem Grenzwert entgegenstrebt, welcher bei erhöhter Konzentration schneller erreicht wird. Hierbei gelang es ihm, das nicht hydrolysierte Glycin zu bestimmen. Die für die Untersuchung ausgewählten Aminosäuren waren Glycin, Alanin, Asparaginsäure und Leucin. Betreffs der Resultate der Einwirkung schreibt *Wunderly*[1]):

„Die Hydrolyse der Aminosäuren geht bis zu einer Grenze, für die es eine Massenwirkungskonstante gibt; die Reaktion ist nicht umkehrbar; sie geht nach der ersten Ordnung, ohne daß eine Hemmung nach dem Quadrat der Konzentration des Reaktionsproduktes sichtbar würde."

Um eigene Ziffern über die Oxydationsaktivität des Eisens in Kohle gegenüber den Aminosäuren zu erhalten, führte ich im Laufe meiner Forschung eine Anzahl diesbezüglicher Versuche nach einer Methode aus, die der von *Wieland* und *Bergel* benutzten sehr ähnlich ist. Als Katalysator fungierte *Kahlbaums* Blutkohle und als Substrat Alanin, welches gleichfalls ein von *Kahlbaum* bezogenes Präparat war. Nachdem die Kohle in den Versuchskolben eingewogen worden war, wurden 5 ccm Alaninlösung mit bekanntem Gehalt und auf 37° vorgewärmt zugesetzt. Der Kolben wurde hierauf in einen Thermostaten verbracht, der auf $37 \pm 0{,}1^0$ gehalten wurde, und mit einer Gasbürette verbunden. Diese und der Versuchskolben wurden dann mit Sauerstoff aus einem Gasometer gefüllt. Hierauf wurde das System geschlossen und der Kolben im Thermostaten mit Hilfe einer besonderen Vorrichtung hin und her bewegt.

Nach Beendigung des Versuchs bestimmte ich die gebildete Kohlensäure durch Ausblasen derselben in eine bekannte Menge Baryt in Übereinstimmung mit *Wielands* Verfahren. Die Kolben wurden hierbei auf 0° abgekühlt, um zu große Verluste an Acetaldehyd und eventuell Essigsäure zu verhindern.

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Oxydationsresultate von der Katalysatormenge mit einer konstanten Alaninmenge von 0,1 g untersucht.

---

[1]) *Wunderly*, Zeitschr. f. physik. Chem., **112**, **193**, **1924**.

Tabelle XXVI.

Kohlenmenge	Erhaltene Menge an					
	CO_2		CH_3CHO		CH_3CO_2H	
g	mg	theoret. Wert Proz.	mg	theoret. Wert Proz.	mg	theoret. Wert Proz.
2,0	20,1	40,69	7,4	14,97	5,5	8,16
1,0	17,7	35,83	7,4	14,97	5,5	8,16
0,5	8,6	17,41	3,7	7,48	2,8	4,15
0,1	4,6	9,31	1,9	3,84	1,9	2,82

Wie ersichtlich, wurde ziemlich früh ein Maximum des Umsatzes erzielt.

Tabelle XXVII.

Einwirkung der Alaninmenge bei konstanter Kohlenmenge von 1 g.

Alaninmenge	Volumenverminderung	Gebildete Menge an					
		CO_2		CH_3CHO		CH_3COOH	
g	ccm	mg	theoret. Wert Proz.	mg	theoret. Wert Proz.	mg	theoret. Wert Proz.
0,2	1,85	18,0	18,2	14,9	15,1	5,5	4,10
0,3	2,35	19,0	12,8	23,6	15,9	7,3	3,60
0,4	2,85	26,0	13,2	25,8	13,0	9,2	3,41
0,5	2,95	26,5	10,7	25,8	10,4	9,2	2,73

Wie aus der Tabelle XXVII hervorgeht, kommt man auch hierbei sehr schnell zu einem Maximum des Umsatzes.

In der zweiten Spalte sind die Volumverminderungen verzeichnet. Diese können infolge besonderer Prüfung sicher nicht auf Gasverluste zurückgeführt werden. Außerdem entstanden diese Verringerungen auch bei einem Unterdruck im Kolben. Die Volumverringerung beruht auch nicht auf der Adsorption von Sauerstoff an Kohle, denn eine Blindprobe mit 1 g Kohle, 5 ccm H_2O und Sauerstoffatmosphäre ergab ein negatives Resultat.

Die Erscheinung dürfte dadurch hervorgerufen worden sein, daß die Kohlensäure an das gleichzeitig gebildete Ammoniak gebunden und von der Lösung zurückgehalten wurde, wie ich oben bereits erwähnte. Es ist nicht ersichtlich, ob *Warburg* bei seinen Versuchen, bei denen nur die Druckverringerungen, allerdings mit Korrektion für die Löslichkeit des entwickelten Gases in der Flüssigkeit studiert werden, diesen Umstand genügend berücksichtigt hat. Die Löslichkeit des Gases ist nämlich nicht konstant, sondern eine Funktion der gebildeten Menge Ammoniak.

Der Eisengehalt des benutzten Kohlepräparats war 3,98 Proz. und der Aschengehalt 21,61 Proz., also besonders hoch. Nach Veraschung auf dem Meckerbrenner wurde 1 g des Kohlenpräparats auf

Konstantgewicht auf der Stichflamme geglüht. Das Eisen wurde nach Aufschluß mit Soda in einer Platinschale jodometrisch bestimmt.

Den höchsten Umsatz in den umstehend angeführten Tabellen liefert die Bildung von 4,6 mg CO_2 mit 0,1 g Kohle. Berechnet man die Oxydationsaktivität auf das Eisen, so erhält man

$$588{,}3 \text{ cmm/mg Fe} \,.\, 24 \text{ Stunden.}$$

Ein Präparat, *Mercks* Adsorptionskohle, welches ungefähr die gleiche Aktivität aufwies, hatte einen Aschengehalt von 2,72 Proz. und einen Eisengehalt von 0,46 Proz. Hierbei würde die Aktivität des Eisens etwa zehnmal größer sein als der obengenannte Wert.

Nach *Warburgs* Untersuchungen[1]) ist der Umsatz nach obenstehender Berechnungsweise für das unbefruchtete Strongylocentrotusei bei 20°[2]) 7000, für das befruchtete Strongylocentrotusei bei 20°[3]) 42000, für die Retina der Säugetiere, das Organ höherer Tiere, das nach unseren Messungen die größte Atmung besitzt, bei 37° 100000.

Die Aktivität des Eisens in Verbindung mit Cystin[4]) ist größer als die oben angeführte in Zellen. Die höchste Aktivität für Eisen, die *Warburg* und seine Mitarbeiter beobachteten, ist nämlich

bei 20° 120000 cmm
„ 37° 400000 „

Bei dem Versuch mit Cystin[5]) ergab sich ein Verbrauch von 6,3 ccm pro Gramm Kohle und Stunde bei 40° und einem O_2-Druck auf 700 mm Hg. Später zeigte es sich, daß Blutkohle 0,26 mg Fe pro Gramm enthielt[6]).

$$\text{Aktivität} = 6300 \text{ cmm}/0{,}26 = 24\,231.$$

Bei Anwendung von Tyrosin bewirken 0,2 g Kohle eine Adsorption unter denselben Bedingungen wie vorher von 67 cmm in 20 Minuten[7]).

$$3 \,.\, 67/0{,}2 \,.\, 0{,}26 = 3865.$$

400 mg derselben Kohle ergaben in 20 Minuten bei 40° eine Adsorption von 49 cmm bei 700 mm Druck und Leucin als Substrat[8]).

$$\text{Aktivität} = 3 \,.\, 49/0{,}4 \,.\, 0{,}26 = 1413.$$

Bei diesen Versuchen wurden folgende Mengen Substrat angewandt: 1,97 mg Cystin, 10 mg Tyrosin und 2,4 mg Leucin.

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 481, 1924.
[2]) *O. Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 231, 1914.
[3]) *Derselbe*, Arch. f. d. ges. Physiol. **160**, 324, 1915.
[4]) *S. Sakuma*, diese Zeitschr. **142**, 68, 1923.
[5]) Ebendaselbst **113**, 269, 1921.
[6]) Ebendaselbst **119**, 163, 1921.
[7]) Ebendaselbst **113**, 278, 1921.
[8]) Ebendaselbst **113**, 280, 1921.

Schwefelhaltige Eiweißstoffe sind, wie mit Recht zu erwarten war, sehr leicht oxydierbar.

Die anderen Zahlen lassen sich mit den von mir erhaltenen Resultaten vergleichen, wenn man, wie oben angedeutet, den hohen Eisengehalt und die lange Versuchszeit berücksichtigt.

Betreffs der Aktivität des Eisens in Kohle schreibt *Warburg*[1]: „Fragen wir, welcher Bestandteil der Häminkohle hierbei katalytisch wirksam ist, so tritt im Prinzip dieselbe Schwierigkeit auf, wie bei Versuchen mit lebenden Zellen: gegeben ist ein Gemisch verschiedenartiger Substanzen, zu entscheiden ist, welcher Bestandteil des Gemisches die beobachtete Wirkung hervorbringt. Doch haben wir hier den großen Vorteil, daß wir das katalytisch wirksame Substanzgemisch künstlich herstellen können. Um unsere Frage zu entscheiden, haben wir nur nötig, verschiedenartige Stoffe zu glühen und die katalytische Wirksamkeit der entstehenden Kohlen mit ihrer chemischen Zusammensetzung zu vergleichen.

Derartige Versuche haben wir ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß Kohlen von der katalytischen Wirksamkeit der Häminkohle immer dann entstehen, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind: wenn das Ausgangsmaterial erstens nichtflüchtigen Stickstoff und zweitens Eisen enthält. Reinigt man geeignete stickstoffhaltige Substanzen sorgfältig, so daß sie nur noch wenig Eisen enthalten, und glüht sie, so entstehen schwach wirksame Kohlen. Tränkt man diese Kohlen mit Eisensalz und glüht sie, so werden sie aktiviert und erlangen die katalytische Wirksamkeit der Häminkohle. Je eisenreicher, um so wirksamer sind die stickstoffhaltigen Kohlen, bis bei einem Eisengehalt von einigen Zehntel Milligrammen pro Gramm Kohle das Maximum der Wirkung erreicht ist.

Keine Aktivierung tritt ein, wenn man stickstoffhaltige Kohlen mit anderen Metallen oder stickstofffreie Kohle mit Eisen glüht. Die katalytisch wirksame Substanz der Häminkohle ist also Eisen, aber nicht Eisen in einer beliebigen Form, sondern Eisen, gebunden an Stickstoff."

Da die Aktivität der Kohle bei Erfüllung der beiden Voraussetzungen: Vorhandensein von Eisen und von Stickstoff in derselben, ein Maximum erreicht, dürften die Voraussetzungen für eine fortgesetzte Behandlung des Problems nach diesen Richtlinien erschöpft sein.

Bei vergleichenden Versuchen über die oxydationsvermittelnde Einwirkung verschiedener Kohlensorten auf Leucin haben *Warburg* und *Brefeld*[2]) ebenfalls besonders interessante Beobachtungen gemacht.

Zuckerkohle weist geringere Oxydationsaktivität auf als Blutkohle, jedoch solche von gleicher Größenordnung. Gleiche Mengen der beiden Kohlensorten adsorbierten aus einer bestimmten Leucinlösung 17 bzw. 30 Proz. der Leucinmenge.

Bei Oxydation des Leucins mit Zuckerkohle tritt Wasserstoffperoxyd als Nebenprodukt auf, was dagegen bei Anwendung von Blutkohle nicht der Fall ist. Ferner ist Blausäure kein spezifischer Vergifter für Zucker-

[1]) Diese Zeitschr. 152, 485, 1924.

[2]) Ebendaselbst 145, 468, 1924.

kohle. Das System Zuckerkohle—Aminosäure könnte darum nach Meinung der Verfasser als geeignetes Beispiel angesehen werden, wenn nicht die spezifische Reaktion auf Blausäure fehlen würde.

Zuckerkohle kann inaktiviert werden, wenn bei ihrer Bereitung das Silikat vorhanden ist. Silikatkohle besitzt das Adsorptionsvermögen der Zuckerkohle, jedoch nicht ihre Aktivität. Sie kann bei der Bereitung durch Zusatz von Hämin aktiviert werden, ohne daß Proportionalität zwischen zugesetzter Menge Hämin und Oxydationsaktivität vorliegt.

Die Häminkohle selbst ist nach *Warburg* sieben- bis zehnmal aktiver als Blutkohle, wenn man ihre Aktivität in folgenden Dimensionen berechnet:

$$Q_1 = \frac{\text{cmm verbrauchter Sauerstoff}}{\text{mg Kohle . Stunde}}. \tag{1}$$

Da der Eisengehalt der Häminkohle bedeutend größer als der der übrigen Kohlensorten ist, beläuft sich die dem vorher angewandten Prinzip:

$$Q_2 = \frac{\text{cmm verbrauchter Sauerstoff}}{\text{mg Eisen . Stunde}}, \tag{2}$$

berechnete Aktivität auf 280 bis 400, also bedeutend weniger als die oben berechneten Aktivitäten des Eisens in Blutkohle.

Ferner hat Häminkohle nur ein Zwanzigstel des Adsorptionsvermögens der Blutkohle.

Aus Anilinfarbstoffen haben die Verfasser Kohlensorten mit höherer Aktivität als die der Häminkohle erhalten, selbst bei Berechnung derselben nach der Formel (1), z. B. aus

Kohle aus	Q_1[1]	Q_2
Safranin	18,2	14 000
Neutralrot	13,6	13 600

Kohle aus Bismarcksbraun besitzt eine zwanzigmal größere Aktivität als technische Blutkohle. Aus der gleichen Leucinlösung adsorbieren die gleichen Mengen der beiden Kohlensorten 4 bzw. 30 Proz.

Die Verfasser können deshalb hierin keinen Zusammenhang zwischen Adsorptionsvermögen und katalytischer Wirkung erblicken, zu welcher Voraussetzung man vom theoretischen Gesichtspunkt geneigt sein könnte.

Das wirksame Prinzip ist also an Stickstoff gebundenes Eisen. Das Verlangen nach einer Bindungsweise, wie sie in Pyrrolringen vorliegt, verleiht den Versuchen keine Stütze.

[1]) *Warburg* und *Brefeld*, diese Zeitschr. 145, 468, 1924.

VI. Bemerkungen zu den Theorien über den Oxydationsmechanismus im Organismus.

A. Allgemeine Gesichtspunkte.

Das Interesse für die Atmungschemie ist zurzeit besonders groß. So studiert *H. von Euler*[1]) den Zusammenhang zwischen den Fetten und Kohlehydraten im Körper im Anschluß an seine früheren Resultate, nach welchen bei dem oxydativen Abbau der Fette Ausgangsmaterial zur Glykogenbildung erhalten wird.

L. Ashers[2]) Mitarbeiter *Calvo-Criado* ficht später dieses Problem in vivo an, und *George Curtis*[3]) findet, daß bei körperlicher Arbeit die Steigerung der Respirationsquote durch die vom Kohlehydrat entwickelte Energie bedingt ist.

Brugsch und seine Mitarbeiter studieren die Glykolyse an organischem Gewebe teils mittels Trockenpräparat[4]) im Anschluß an die diesbezüglichen Untersuchungen *von Eulers, Myrbäcks* und *Karlssons*[5]) und teils mit gewöhnlichem Gewebe[6]).

Heianzan untersucht den Einfluß der Ionenwirkung auf gewisse Funktionen der Leber und auf den Kohlehydratumsatz in diesem Organ, in drei aufeinander folgenden, kürzlich veröffentlichten Abhandlungen[7]) beschrieben.

Ferner sind *Grafe*[8]), *Reinwein* und *Singer* mit dem Problem der Zellatmung beschäftigt. Die Glykolysewirkung hat *Negelein*[9]) als Versuchsobjekt gewählt, und zwar in embryonalem Gewebe.

Diese kleine Übersicht mag genügen, um zu beleuchten, welche zentrale Stellung die Erforschung derjenigen chemischen Reaktionen, die wir mit dem gemeinsamen Namen Atmung bezeichnen, und die Bedingungen für das Eintreten derselben, tatsächlich einnehmen.

Warburg und *Wieland* haben in ihren an anderer Stelle behandelten Theorien versucht, die vorherrschenden Prinzipien, welche den genannten Reaktionen zugrunde liegen, näher zu präzisieren.

Dies dürfte vielleicht etwas verfrüht erscheinen, da die Anzahl der hierher gehörenden, näher bekannten Reaktionen noch recht beschränkt ist. *Wieland* schreibt aber hierüber[10]):

---

[1]) *von Euler*, diese Zeitschr. **164**, 18, 1925.
[2]) *Asher*, ebendaselbst **164**, 76, 1925.
[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **164**, 97, 1925.
[4]) *Brugsch* und *Horsters*, ebendaselbst **164**, 191, 1925.
[5]) *von Euler, Myrbäck* und *Karlsson*, H. **148**, Heft 4 bis 6, 1925.
[6]) *Brugsch, Cahen* und *Horsters*, diese Zeitschr. **164**, 199, 1925; *Brugsch, Horsters* und *Vorschütz*, ebendaselbst **164**, 207, 1925; *Brugsch, Horsters* und *Narita*, ebendaselbst **164**, 247, 1925; *dieselben*, ebendaselbst **164**, 257, 1925; *Brugsch, Horsters* und *Harada*, ebendaselbst **164**, 271, 1925.
[7]) *Heianzan*, ebendaselbst **165**, 33, 57 und 81, 1925.
[8]) *Grafe, Reinwein* und *Singer*, ebendaselbst **165**, 102, 1925.
[9]) *Negelein*, ebendaselbst **165**, 122, 1925.
[10]) *Wieland*, Ergebn. d. Physiol. **20**, 477, 1922.

„Man wird auch feststellen, daß die Linie der sicheren „Ergebnisse" häufig überschritten, daß die Darstellung vielfach durchsetzt ist mit hypothetischen Einschlägen und mit Ableitungen, die der experimentell gesicherten Grundlage entbehren. Dies liegt in der Natur des Stoffes und in der bewußten Absicht des Verfassers. Die hier vertretenen Vorstellungen sind bisher nur auf Teilgebieten der biologischen Oxydation experimentell geprüft worden und haben sich dort bewährt. Sie streben darnach, in weiterem Umfang der entscheidenden Instanz des Experiments zugeführt zu werden. Die einfache Grundreaktion der Wasserstoffverschiebung führt mit zwingender Gewalt zu einer einheitlichen Umfassung aller Zellvorgänge, bei denen irgendeine Änderung des Oxydationswertes der beteiligten Stoffe im Spiele ist."

Warburgs und *Wielands* Art, sich die auf einem Gebiet gemachten Erfahrungen auf einem anderen nutzbringend zu machen, ist natürlich völlig berechtigt, wenn man sich auch hierbei vor Augen halten muß, daß eine Parallele mehr oder weniger vollständig sein kann.

Im folgenden möchte ich die beiden Theorien in Kürze besprechen.

B. Bemerkungen zur Warburgschen Theorie.

Wie ich bereits früher dargetan habe, geht *Warburg* von der Tatsache aus, daß nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse jede lebende Zelle Eisen enthält. Er übernimmt dabei die seit *Lavoisier* vielfach betonte Sentenz, daß Leben ohne Eisen unmöglich ist, und wirft auf Grund früherer und besonders eigener experimenteller Ergebnisse die Behauptung auf: „Der sauerstoffübertragende Bestandteil des Atmungsferments ist Eisen". An die Seite spezifischer chemischer Kräfte stellt *Warburg* als wesentlichen Faktor bei der Atmung der lebenden Substanz die unspezifischen Oberflächenkräfte: „Die Atmung ist eine Reaktion an Oberflächen"[1]).

Betreffs des Versuchsmaterials *Warburgs* scheint, wie bereits früher hervorgehoben ist, die Katalyse der Oxydation von Aminosäuren durch organische Kohle kaum als „Modell" für den entsprechenden Sauerstoffverbrauch in den Zellen angesehen werden zu können. Erstens werden die Aminosäuren nicht als ganze Moleküle verbrannt, sondern sicher zuerst durch Reaktionen in der Zellflüssigkeit zu Verbindungen mit drei Kohleatomen gespalten, ehe sie ausoxydieren. Zweitens endet die Oxydation z. B. von Alanin nach *Wieland* nicht mit Kohlensäure, Ammoniak und Wasser, sondern, wie auch ich vorher Gelegenheit darzulegen hatte, mit Essigsäure und Acetaldehyd in schlechter Ausbeute.

[1]) Siehe den zusammenfassenden Vortrag Ber. d. d. chem. Ges. 58, 1001, 1925, komplettiert durch *Ellinger* Ber. d. d. chem. Ges. 58, 1547, 1925.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Aktivität einer gewissen Kohle vom Eisengehalt der letzteren erscheint es nicht ausgeschlossen, daß die Aktivität und das Adsorptionsvermögen der Kohle schon allein durch Kochen mit Salzsäure und Präparieren mit Eisensalzen verändert werden kann.

Katalysatoren wie Platinschwamm und Palladiumschwarz erwiesen sich von besonders leicht veränderlicher Aktivität. Hierbei sei auf *Willstätters* Versuche über die Hydrierungsaktivität von Palladiumschwarz bei der Hydrierung von organischen Stoffen mit molekularem Wasserstoff näher hingewiesen. Als sicher darf wohl angesehen werden, daß dieselbe Eigenschaft auch bei der Kohle vorkommt, wenn auch vielleicht mit geringerer Variationsbreite. Um vollständige Gewißheit zu erlangen, scheint es erforderlich zu sein, das Kochen und Glühen fortzusetzen und die Präparate auf ihre Aktivität hin so lange zu untersuchen, bis diese konstant geworden ist. Daß zwei Kohlesorten mit ein und demselben Eisengehalt, jedoch mit ungleicher Vorbehandlung, verschieden starke Oxydationsaktivität haben können, ist sehr wahrscheinlich, da die Kohle ein stark wechselndes Adsorptionsvermögen besitzt. Eine Berechnung der Oxydationsaktivität der Kohle im Vergleich zum Eisen scheint darum zu irgendwelchen reproduzierbaren Resultaten nicht zu führen.

Hinsichtlich des Resultats der Kohleversuche ist bemerkenswert, daß die Kohlesorten mit höchster Aktivität das geringste Adsorptionsvermögen besaßen, und ferner, daß bei Anwendung von Zuckerkohle Wasserstoffperoxyd als Reaktionsprodukt nachgewiesen wurde.

Die verschiedenen Kohlesorten zeigen nach den Versuchen *Warburgs* ein besonders variierendes Verhalten. Warum gerade technische Blutkohle ein „brauchbares Modell“ sein soll, scheint nicht genügend begründet zu sein.

A priori anzunehmen, die Oxydation von Aminosäuren im lebenden Gewebe und mit Kohle und molekularem Sauerstoff verliefe so ähnlich, daß man daraus auf gegenseitige chemische Relationen der entsprechenden Katalysatoren zu schließen berechtigt wäre, scheint ferner ziemlich fraglich.

Betreffs der Blausäurevergiftung muß man, wie bereits hervorgehoben, die verschiedene Vergiftung in vivo und in vitro berücksichtigen. Meine eigenen Versuche haben an die Hand gegeben, daß bei Katalase die einem gewissen Vergiftungsgrad entsprechende Blausäuremenge nicht proportional der zugesetzten Eisenmenge wechselt.

Außerdem werden Katalase von Stoffen wie Phenylhydrazin und Hydroxylamin in einem Grade vergiftet, der nach *Warburg* spezifisch

ist, ohne irgendwelche besonderen Relationen zum Eisen zu haben. Katalase ist jedoch gegen oxydative und reduktive Einflüsse besonders empfindlich. Es erübrigt sich deshalb die Untersuchung, ob diese Vergiftungen auch reversibel sind. Es dürfte jedoch an negativen Beweisen gegen die Theorie der Blausäure als spezifischem Vergifter oxydativer Prozesse und deren Katalysierung durch ausschließliche Eisenverbindungen nicht fehlen.

Die Atmung besteht sicherlich aus einem wenigstens zurzeit unübersehbaren Komplex von Teilreaktionen, von denen eine jede durch ihr zugehöriges Enzym katalysiert wird.

Ob die letztgenannten eine so ausgeprägte Relation zueinander haben, daß ein allgemein vorherrschendes Prinzip hierin zu spüren wäre, wie es *Warburg* vorauszusetzen scheint, ist eine Frage, deren Beantwortung noch im weiten Felde steht.

Wenn also die experimentelle Beweisführung *Warburgs* in gewissen Punkten, besonders betreffs der Auffassung von der Blausäurevergiftung, als Ermittler der Eisenkatalysatoren meines Erachtens als fraglich anzusehen ist, so läßt es sich doch nicht von der Hand weisen, daß das Eisen eine wesentliche Rolle bei der Atmung spielt.

Warburg verschärft seine Auffassung mehr und mehr gegenüber derjenigen *Wielands*. Es erscheint jedoch berechtigt, *Morgulis* oben angegebenem Wege, der auf die Vereinigung der beiden Theorien hinzielt, zu folgen. Ein solches Verhalten ließe sich so erklären, daß HCN die Reaktion der Bernsteinsäure mit molekularem Sauerstoff, aber nicht mit Methylenblau vergiftet. *Warburg* nimmt an, daß die Stoffe durch Adsorption an die Zellenwände aktiviert werden; worin jedoch diese Aktivierung besteht, scheint nicht näher präzisiert zu sein. Wenn die Aktivierung nur durch die Konzentrationsverstärkung zustande kommt, würden ja Aktivität und Adsorptionsvermögen parallel gehen, was bei *Warburgs* Kohleversuchen nicht der Fall war. Hier gibt also *Wielands* Theorie nähere Aufklärung.

C. Bemerkungen zur Wielandschen Theorie.

Die von *Loew* zuerst geäußerte Auffassung über die Wirkung der Katalase in Zellen hat *Wieland* in seinen ausgezeichneten Studien über Oxydationsprozesse und deren Katalysatoren allseitig beleuchtet.

„Wir glauben“, schreibt *Wieland*[1]), „daß sich schon jetzt eine weitere, sehr verbreitete Enzymwirkung auch jenem Reaktionssystem (dem Oxydoreduktionssystem im Organismus) angliedern läßt, nämlich die katalytische Zersetzung des Hydroperoxyds in Wasser und Sauerstoff, die durch die sogenannten *Katalasen* ungemein stark beschleunigt wird.“

---

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 55, 3646, 1922.

Nach *Wielands* Theorie ist, wie bereits hervorgehoben, das Hydroperoxyd das erste Produkt der Hydrierung des molekularen Sauerstoffs, und es muß auch während der Atmung im Organismus in erster Phase Hydroperoxyd gebildet werden, und zwar durch Oxydation von aktiviertem Wasserstoff mit molekularem Sauerstoff als Akzeptor.

Jahrzehntelange Diskussion dieses Problems von der Aufgabe der Katalase im Organ hat, soweit mir bekannt, keine Theorie von nur annähernder Tragweite wie die von *Wieland* ausgeformte hervorbringen können. Dies dürfte als eine der stärksten Stützen der *Wieland*schen Theorie angesehen werden können. Nach *Warburg* wäre das Enzym Katalase eine Eisenverbindung[1]), die Frage von dessen physiologischer Aufgabe scheint aber nicht beantwortet zu werden. Obgleich das Wasserstoffperoxyd ein Nebenprodukt bei vielen Oxydationen ist, konnte dessen Auftreten im Organ trotz eifriger Versuche in dieser Richtung nicht nachgewiesen werden. Ferner ist die Schädlichkeit von H_2O_2 für das organische Gewebe sehr verschieden beurteilt worden.

Die erstere Tatsache gründet sich darauf, daß die Katalase eine viel höhere Empfindlichkeit gegen Blausäure besitzt, als die Reduktase aufweist. Bei Blausäurevergiftung eines Organs sollte aus diesem Grunde das H_2O_2-bildende Enzym nicht vergiftet werden, dagegen das H_2O_2-spaltende, weshalb H_2O_2 aus diesem Grunde nachgewiesen werden könnte. Inzwischen verhält sich aber die Katalase bedeutend anders in vitro als in vivo.

H_2O_2 dürfte auch als Zwischenprodukt bei der Oxydation im Organismus auftreten können, selbst wenn dessen Schädlichkeit für das lebende Gewebe nicht so ungemein groß wäre.

Es hat sich ergeben, daß jede Oxydation parallel mit einer oder sogar durch eine Reduktion bedingt ist, und vice versa, und deshalb spielen wahrscheinlich die Reduktionsprozesse beim Stoffwechsel in den Organen eine große Rolle, wenn man auch zurzeit nur über eine begrenzte Anzahl von Beispielen hierfür verfügt. Die enzymatische Dehydrierung von Alkoholen zu Aldehyden und weiter zu Säuren ist altbekannt. Betreffs der Dehydrierung der Bernsteinsäure, einem Prozeß, der beim Abbau der Fettsäuren im Körper eine vorherrschende Rolle zu haben scheint, nahm ich bereits früher auf die Arbeiten von *Ahlgren* und *Thunberg* Bezug. Das Enzym Reduktase ist ferner der Gegenstand eines besonders eingehenden Studiums am hiesigen Institut[2]).

---

[1]) Diese Zeitschr. **186**, 270, 1923.

[2]) *H. v. Euler* und *R. Nilsson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **149**, 44, 1925; **151**, 155, 1926; **152**, 264, 1926.

Betreffs der Kohlehydrate hat *Wieland*[1]) gefunden, daß „auch Glucose durch das Ferment der Essigsäurebakterien mit Methylenblau sauerstofflos zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt wird“. *Ahlgren*[2]) findet jedoch, daß α, β-Glucose kein direkter Wasserstoffdonator ist, sondern in Milchsäure gespalten wird.

Zusammenfassung.

Im folgenden werden die Hauptergebnisse meiner bisherigen Untersuchungen über Leberkatalase zusammengestellt.

1. Es wurde die Gültigkeit der von *Euler* und *Josephson* vorgeschlagenen Aktivitätsformel

$$\left(\text{Kat.f.} = \frac{\text{Reaktionskonstante}}{\text{Gramm Enzympräparat}}\right)$$

zur Charakterisierung der Wirksamkeit von Katalasepräparaten bei Benutzung niedriger Substratkonzentrationen ($< 0{,}015$ n H_2O_2) festgestellt (S. 318 und 319).

2. Die inaktivierende Wirkung des Substrats auf das Enzym wurde untersucht.

Hierbei wurde eine direkte oxydative Zerstörung des Enzyms konstatiert. Irgendwelche Proportionalität zwischen der Anzahl umgesetzter Moleküle H_2O_2 und des Aktivitätsverlustes scheint aber nicht vorzuliegen.

3. Eine Reingewinnungsuntersuchung des Enzyms bei Benutzung des *Willstätter*schen Adsorptionsverfahrens wurde mit Pferdeleber als Ausgangsmaterial vorgenommen (S. 317 bis 341).

Die Aciditätsbedingungen der Adsorption und Elution des Enzyms wurden bei Verwendung von Kaolin bzw. Tonerdehydrat als Adsorptionsmittel studiert

Es wurden Präparate von Kat.f. gleich etwa 20000 bis 25000 dargestellt, deren Aktivität also die der Lebersubstanz um das 300- bis 400fache übertrifft (S. 334).

Die Aschengehalte derselben variieren zwischen 11,3 bis 12,8 Proz., die Eisengehalte zwischen 3,3 bis 4,1 Proz. (S. 320, 331 und 334).

4. Der Einfluß der Substratkonzentration auf die Geschwindigkeit der Katalasewirkung wurde untersucht; aus dem Verlauf der Aktivitäts-(S)-Kurve läßt sich der Wert K_M auf rund 22 als erste Orientierung schätzen. Die Größenordnung ist also dieselbe, wie die bei anderen daraufhin untersuchten Enzymen.

[1]) *Wieland*, Ergebn. d. Physiol. 20, 494, 1922.

[2]) *Ahlgren*, Skand. Arch. f. Physiol. 47, suppl, 203.

5. Die Abhängigkeit der Thermo-Inaktivierung des Enzyms von der Zeit liefert eine Stütze für die Annahme von Enzymhomologen verschiedener Stabilität. Die Inaktivierungskonstante $\left(K_c = \frac{1}{t} \log \frac{k_a}{k_t}\right)$ läßt sich auf 0,0534 und 0,0020 berechnen.

6. Die *von Euler*schen Aktivierungen von Hefe- und Blutkatalase durch Protoplasmagifte, wie Toluol und Alkohol, wurden an Lebersubstanz reproduziert, und zwar erwiesen sie sich auch an diesem Beispiel als durch die Gegenwart von Zellen bedingt (S. 323).

7. Die Bestimmung des Eisengehalts in Katalasepräparaten verschiedenen Reinheitsgrades scheint keine Relation zwischen Eisengehalt und enzymatischer Wirksamkeit zu liefern (S. 320).

Die Aktivität der erhaltenen hochaktiven Katalasepräparate, auf den Eisengehalt als einzige aktive Gruppe des Enzyms berechnet, (cmm O_2/mg Fe . Stunde), liefert Zahlen, die zwischen 10000000 und 100000000 liegen (S. 343).

Zum Vergleich seien die von *Warburg* für Eisen bei dessen Katalyse der Oxydation Cystein → Cystin erhaltene Ziffer, nämlich 400000, sowie die Ziffern für lebende Zellen, 7000 bis 100000, und für Eisen in organischer Kohle bei Oxydation von Aminosäuren, nämlich 1000 bis 25000[1]), angeführt (S. 362).

Auf letzterem Gebiet von mir angestellte Versuche ergaben niedrigere Werte (S. 362).

8. Anhaltspunkte für oder gegen die Annahme des Eisens als aktiver Gruppe des Enzyms liefert obige Berechnung aber nicht, da das Verhältnis zwischen zugesetzter Menge an Trockensubstanz Enzym und dabei zugesetzter Eisenmenge an der Seite der Aktivitätszahlen verschwindet (S. 343).

9. Das Verhalten der hochaktiven Katalasepräparate zur Blausäure liefert keine Stütze für die *Warburg*sche Annahme der Blausäure als spezifischem Vergifter des Eisens in der Katalase (S. 351).

10. Die *Wieland*sche sowie die *Warburg*sche Theorie der Oxydation im Organismus wurden, teilweise auf Grund meiner eigenen Ergebnisse, besprochen und dabei hervorgehoben, daß das *Warburg*sche Versuchsmaterial zu so weitgehenden Verallgemeinerungen, wie sie von diesem Forscher gemacht worden sind, kaum auszureichen scheint (S. 365 bis 370).

[1]) Nach meinen Berechnungen.

Über die Wechselwirkung zwischen hydrophoben Solen und Pseudoglobulin aus normalem und Antidiphtherieserum.

Von

A. Rabinerson.

(Aus der Biochemischen Abteilung des Bakteriologischen Instituts „Pasteur" zu Leningrad.)

(Eingegangen am 2. März 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Beeinflussung der Beständigkeit von hydrophoben Solen durch Pseudoglobulin aus normalem und Immunserum wurde von *Reitstötter*[1]) und dann von *Freundlich* und *Beck*[2]) eingehend studiert. Die Ergebnisse dieser Autoren, die gut übereinstimmen, zeigen, daß die aus einem antitoxischen Serum gewonnene elektrolytfreie Pseudoglobulinfraktion ein Fe_2O_3-Sol stärker sensibilisiert als das Pseudoglobulin aus einem normalen Serum. Aus meinen eigenen Untersuchungen geht hervor, daß bei der Wechselwirkung zwischen Pseudoglobulinen aus normalem und Immunserum einerseits und hydrophoben Solen andererseits noch gewisse andere Unterschiede auftreten. Eine Erklärung dieser Erscheinungen wird jedoch erst dann möglich sein, wenn eine Prüfung sämtlicher Mischungsverhältnisse beider Komponenten in Gegenwart von Elektrolyten verschiedener Konzentration vorgenommen wird. Als hydrophobe Kolloide wurden ein negatives Berlinerblausol und ein positives Fe_2O_3-Sol gewählt. Die elektrolytfreien Pseudoglobulinfraktionen aus Normal-Pferdeblutserum sowie aus Antidiphtherieserum (1 ccm = 200 A.-E.) wurden durch Aussalzen mit Ammonsulfat und nachfolgende Dialyse gewonnen. Die Versuchsanordnung war stets die folgende: Es wurden je 0,5 ccm eines jeden Sols in das Probierglas abpipettiert und das Kolloidgemisch mit 1 ccm Kochsalzlösung vermengt. Die Versuchsergebnisse sind graphisch mittels vorstehender Kurven wiedergegeben; die Ordinaten

---

1) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 30, 507, 1920.
2) Diese Zeitschr. 166, 190, 1925.

bedeuten den Flockungsgrad in einem willkürlichen Maße, die Abszissenzahlen stellen die Mengenverhältnisse beider Sole dar in Prozenten des Gesamtgehalts der Lösung an kolloidaler Substanz. Das linke Ende der Abszisse entspricht dem reinen hydrophoben Sol (100 Proz.), das rechte dem reinen Globulinsol. Die links von den Abbildungen stehenden Zahlen bedeuten die Kochsalzkonzentration, ausgedrückt in Millimol im Liter.

Wir betrachten zunächst die Gemische von Berlinerblausol mit den beiden angeführten Arten von Pseudoglobulin. Auf Abb. 1 sind die Ergebnisse beider Versuchsreihen wiedergegeben. Abb. 1, *A* entspricht dem aus einem Normalserum stammenden Globulin; Abb. 1, *B* dem Globulin aus Antidiphtherieserum.

Die Mengenverhältnisse der Sole waren in den beiden Versuchsreihen dieselben; folgende Gemische wurden geprüft:

Gewichtskonzentration	$Fe_4(FeCy_6)_3$	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	Globulin	0,005	0,0125	0,025	0,05	0,125	0,25	0,5
Prozentverhältnis der beid. Sole im Gemisch	$Fe_4(FeCy_6)_3$	90,91	80	66,67	50	28,57	16,67	9,09
	Globulin	9,09	20	33,33	50	71,43	83,33	90,91

Es ist zu bemerken, daß das reine $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sol von 500 Millimol NaCl im Liter unvollständig, von 1000 Millimol dagegen völlig ausgeflockt wurde. Behandelt sei zunächst das Immunglobulin enthaltende Gemisch (Abb. 1, *B*). Im elektrolytfreien Medium (NaCl-Konzentration = 0) reagieren die beiden Komponenten untereinander gar nicht. Die Flockungskurve fällt infolgedessen mit der Abszisse zusammen. Erst in Gegenwart von 100 Millimol NaCl treten Flockungserscheinungen auf. Wie man aus Abb. 1, *B* ersehen kann, ist die Koagulationszone auf bestimmte Mischungsverhältnisse von Berlinerblau und Eiweiß beschränkt; das Flockungsoptimum tritt bei gleichen Gewichtskonzentrationen der beiden Bestandteile auf. Der höchste Punkt der Kurve stellt jedoch eine unvollständige Flockung dar. Zu beiden Seiten, d. h. bei Überschuß von Berlinerblau [76,67 Proz. $Fe_4(FeCy_6)_3$, 33,33 Proz. Globulin] oder von Eiweiß [71,43 Proz. Globulin, 28,57 Proz. $Fe_4(FeCy_6)_3$], wird der Flockungsgrad noch geringer. Bei noch größerem Überschuß eines der beiden Bestandteile (80 Proz. $Fe_4(FeCy_6)_3$ oder auch 83,33 Proz. Globulin) treten so gut wie gar keine Flockungserscheinungen auf. Infolge der Einwirkung höherer Elektrolytkonzentrationen, die jedoch unterhalb des Trübungswertes[1]) des reinen $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sols liegen (350 Millimol. NaCl im Liter), wird die Flockungskurve umgewandelt, und zwar derart, daß sowohl der Gipfel als auch beide Äste der Kurve sich heben. Es ist zu betonen, daß der Gipfel der Kurve dabei denselben Mengenverhältnissen der Sole entspricht. Sehr interessant sind die weiteren Umformungen unserer Flockungskurve. Von 500 Millimol NaCl im Liter wird das reine $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sol unvollständig geflockt (die überstehende Flüssigkeit ist gefärbt). Bei dieser Kochsalzkonzentration wird aber der Gipfel der Kurve noch höher emporgehoben als es bei 350 Millimol der Fall ist, indem er bereits eine vollständige Koagulation darstellt (die überstehende Flüssigkeit ist wasserhell). Ferner wird auch der linke Ast der Kurve emporgehoben, der rechte dagegen viel schwächer. Noch höhere Elektrolytkonzentrationen (die oberhalb des Koagulationswertes des reinen

[1]) 500 Millimol NaCl im Liter.

Berlinerblausols liegen) wandeln selbstverständlich den linken Ast in eine Gerade um, die parallel mit der Abszisse auf der Höhe der völligen Flockung liegt. Der rechte Ast dagegen kann in seiner ganzen Länge derart nie umgewandelt werden, er wird allein emporgehoben.

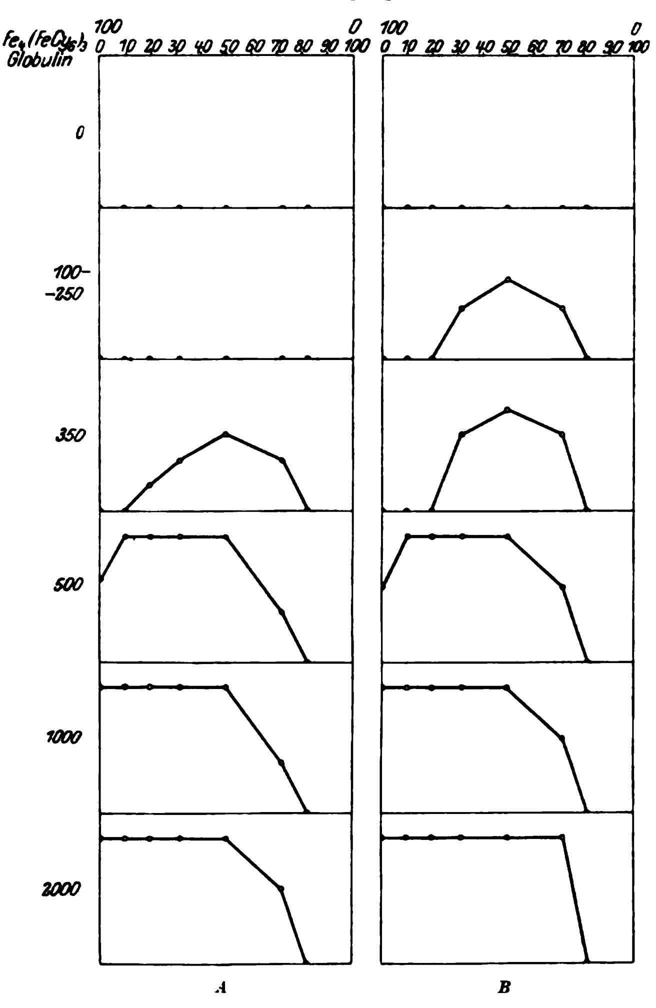


Abb. 1. Graphische Darstellung der Wechselwirkung zwischen dem Berlinerblausol und Pseudoglobulin aus normalem (*A*) und Antidiphtherieserum (*B*). Die links von den Figuren stehenden Zahlen bedeuten die NaCl-Konzentration, Millimol im Liter. Die oberen Zahlen bedeuten den Prozentgehalt der Gemische an Globulin.

Sucht man die soeben geschilderten Erscheinungen vom Standpunkt des Sensibilisierungsprozesses und der Schutzwirkung zu beurteilen, so ergibt sich folgendes:

Betrachten wir diejenige Flockungskurve, die einer Kochsalzkonzentration von 500 Millimol im Liter entspricht. Es ist klar, daß der

linke emporsteigende Ast der Kurve die Sensibilisierung des $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sols durch Globulin graphisch darstellt: das reine Berlinerblausol wird ja von 500 Millimol NaCl im Liter nur teilweise, bei Zusatz von 9,09 bis 50 Proz. Globulin dagegen völlig geflockt. Bei Überschuß von Eiweiß (71,43 Proz. Globulin, 28,57 Proz. Berlinerblau) wird die Koagulation wieder unvollständig, bis sie schließlich völlig aufhört (83,33 Proz. Globulin). Vom Standpunkt der Beständigkeit des $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sols betrachtet, kann der rechte Ast der Kurve als graphische Darstellung der Schutzwirkung angesprochen werden. In der Tat nimmt die fragliche Schutzwirkung mit steigender Elektrolytkonzentration ab.

Der rechte Ast unserer Kurven kann aber auch anders gedeutet werden. Wie oben erwähnt, werden beide Äste, sowohl der linke als auch der rechte, von steigenden Salzkonzentrationen emporgehoben. Stellt der linke Ast die Sensibilisierung des Berlinerblausols durch Globulin dar, so kann der rechte Ast als graphische Darstellung der Sensibilisierung von Globulin durch das $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sol gelten. Da aber das hydrophobe $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sol von NaCl auch ohne Zusatz von Eiweiß gefällt wird, das hydrophile Globulin dagegen nicht, so scheint es selbstverständlich zu sein, daß der linke Ast von hohen Salzkonzentrationen zu einer horizontalen Geraden umgewandelt wird, der rechte Ast aber nur emporgehoben. Daß beide Äste tatsächlich ähnliche Prozesse darstellen (Sensibilisierung des im Überschuß vorhandenen Bestandteils durch den im Unterschuß anwesenden), erhellt wohl zur Genüge aus der Betrachtung jener Kurven, die den unterhalb des Flockungswertes des $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sols liegenden Salzkonzentrationen entsprechen, wo nämlich beide Äste ziemlich gleichartig entwickelt sind.

Der Vergleich sämtlicher Kurven untereinander zeigt ferner, daß die Begriffe Sensibilisierung sowie Schutzwirkung eigentlich nur als Äußerungen gewisser Bedingungen aufgefaßt werden können, indem sie keineswegs in der Natur der Sache begründete Erscheinungen charakterisieren. Wenden wir uns z. B. jenem Gemisch zu, das 71,43 Proz. Globulin und 28,57 Proz. $Fe_4(FeCy_6)_3$ enthält. In einer 100 bis 350 Millimol im Liter enthaltenden Kochsalzlösung wird das fragliche Gemisch unvollständig geflockt. Da aber das reine Berlinerblausol von diesen Salzkonzentrationen weder geflockt noch getrübt wird, so scheint es gerechtfertigt zu sein, von Sensibilisierung vom Berlinerblausol durch Globulin zu sprechen. In einer n Lösung von NaCl übt dagegen dieselbe Menge Eiweiß eine ausgesprochene Schutzwirkung aus!

Wenden wir uns nun dem Verhalten der Gemische vom $Fe_4(FeCy_6)_3$-Sol mit dem aus einem Normalpferdeserum stammenden Pseudoglobulin zu. Wie aus Abb. 1, *A* ersichtlich ist, wird das fragliche Gemenge erst von einer 350 Millimol im Liter enthaltenden Kochsalzlösung zur Flockung gebracht. Weder 100 noch 250 Millimol im Liter vermögen dies zu tun. Der Gipfel der Flockungskurve, die bei 350 Millimol NaCl im Liter auftritt, liegt aber niedriger, als es bei derselben Salzkonzentration im Gemisch mit Immunglobulin der Fall ist. Demzufolge sind auch beide Äste niedriger gelegen. Die Mengenverhältnisse dagegen, die dem Gipfel der Kurve (Fällungsoptimum) entsprechen, sind dieselben, und zwar 50 Proz. Globulin und 50 Proz. Berlinerblau. Bei höheren NaCl-Konzentrationen wird der linke Ast ebenso umgewandelt, wie es in der obigen Versuchsreihe der Fall ist, der rechte dagegen bleibt stets niedriger, als im Gemisch mit Immunglobulin.

Es ergeben sich aus diesen Versuchen zunächst folgende Tatsachen: 1. Die Schutzwirkung des Pseudoglobulins aus einem Normalserum ist

größer als die des aus einem Immunserum stammenden Pseudoglobulins (so wird z. B. das 71,43 Proz. Normalglobulin enthaltende Gemisch von 2000 Millimol NaCl nur teilweise geflockt, während es im Falle von Immunglobulin vollständig koaguliert wird). 2. Das Pseudoglobulin aus dem Antidiphtherieserum sensibilisiert das Berlinerblausol stärker als das Pseudoglobulin aus n Serum.

Es liegt auf der Hand, daß beide Unterschiede infolge der größeren Beständigkeit des n Globulins zum Vorschein kommen. Der Vergleich der beiden Äste unserer Kurven zeigt ja, daß je beständiger ein Sol ist, desto geringer das Emporheben des ihm entsprechenden Astes ist. Dasselbe gilt auch, falls wir die beiden Pseudoglobuline untereinander vergleichen: das aus einem Antidiphtherieserum stammende Pseudoglobulin ist ausgesprochen mehr hydrophob als das aus einem n Serum gewonnene.

Wenden wir uns nun dem Fe_2O_3-Globulinsol zu. Die Versuche sind mit folgenden Gemischen aufgestellt worden:

Gewichtskonzentration:

Fe_2O_3 .	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,025	0,01
Globulin	0,0019	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,15	0,25	0,25	0,25	0,25

Prozentverhältnis der Sole im Gemisch.

Fe_2O_3 .	98,14	96,54	92,76	86,51	76,16	61,54	40	28,57	16,67	9,09	3,85
Globulin	1,86	3,46	7,24	13,49	23,84	38,46	60	71,43	83,33	90,91	96,15

Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind auf Abb. 2 graphisch wiedergegeben. (*A*: n Globulin, *B*: Globulin aus Antidiphtherieserum). Wenden wir uns vorerst dem Gemisch vom Fe_2O_3-Sol mit dem Normalglobulin zu (Abb. 2, *A*). Wie aus der Abb. 2, *A* ersichtlich ist, gibt das Solgemisch, mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration vermengt, zwei voneinander scharf getrennte Flockungszonen, und zwar liegt die eine derselben im Gebiet der hohen Eiweißkonzentrationen (rechte Kurve), die andere dagegen bei sehr geringer.

Die linke Kurve stellt die gegenseitige Ausflockung des Eisenoxydsols und des Globulinsols graphisch dar. Die Ausflockung tritt, wie aus der Abb. 2, *A* ersichtlich ist, erst bei Zusatz von 50 Millimol NaCl auf, während sie bei dieser Salzkonzentration nur unvollständig ist (Trübung). Der optimale Punkt dieser Zone (der Gipfel der linken Kurve) entspricht einem Gehalt von 86,51 Proz. Fe_2O_3 und 13,49 Proz. Globulin des Gemisches. Mit steigender Kochsalzkonzentration wird der Flockungsgrad gesteigert und die Flockungszone verbreitert; dementsprechend liegt der Gipfel der Kurve höher, indem die Äste derselben gleichfalls emporgehoben und verbreitert werden. Die weiteren Umformungen der Flockungskurve gestalten sich mit zunehmender Kochsalzkonzentration wie folgt: Die Äste der Kurve werden noch höher und breiter, indem der linke Ast, welcher dem Überschuß des hydrophoben Fe_2O_3-Sols entspricht und somit die Sensibilisierung desselben durch Globulin darstellt, steil in die Höhe wächst, bis er endlich nach dem Überschreiten des Koagulationswertes des reinen Fe_2O_3-Sols [500 Millimol NaCl im Liter[1]] zu einer geraden Linie wird, welche auf der Höhe des Flockungsmaximums parallel mit der Abszisse verläuft.

[1]) Von 250 Millimol wird das reine, 0,1 Proz. Fe_2O_3 enthaltende Eisenoxydsol getrübt, von 350 aber unvollständig geflockt (die überstehende Flüssigkeit ist intensiv gefärbt).

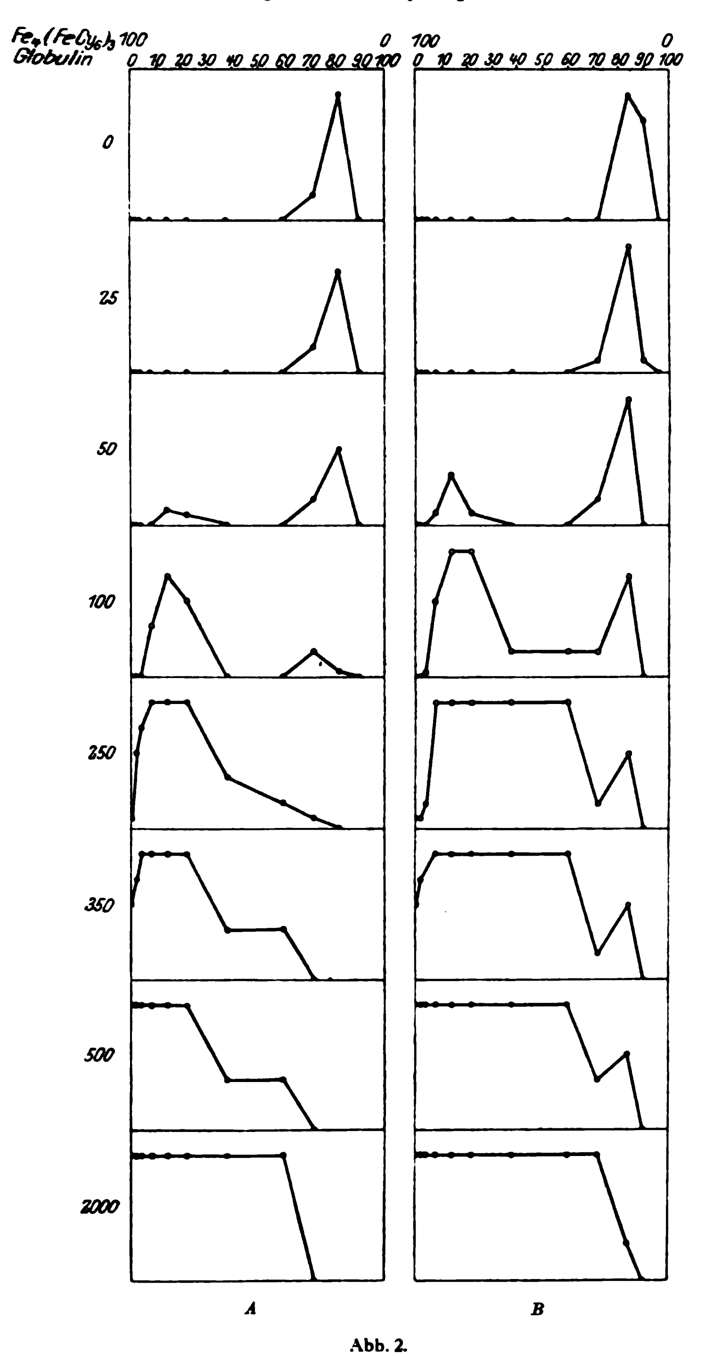


Abb. 2.
Fe_2O_3-Sol und Pseudoglobulin aus normalem (*A*) und Antidiphtherieserum (*B*).

Ebenso, wie es beim Berlinerblau-Globulinsol der Fall ist, wird der rechte Ast der Kurve mit zunehmnder Salzkonzentration viel weniger emporgehoben als der linke.

Ganz anders liegen die Verhältnisse in der zweiten Flockungszone, deren graphische Darstellung die rechte Kurve ist. Die fragliche Zone tritt, im Gegensatz zu der soeben beschriebenen, bereits im elektrolytfreien Medium auf, indem eine völlige Ausflockung den Mengenverhältnissen 83,33 Proz. Eiweiß und 16,67 Proz. Fe_2O_3 entspricht.

Bei Zusatz von Kochsalz wird die Flockung unvollständig, bis sie endlich — bei genügenden NaCl-Konzentrationen — völlig verschwindet. Mit anderen Worten, das sich bildende Koagulum wird vom Kochsalz peptisiert.

Es liegt auf der Hand, daß die fragliche Flockungszone als Ergebnis ganz anderer Erscheinungen, die mit der typischen gegenseitigen Ausflockung zweier Sole nichts zu tun haben, auftritt. *Krebs*[1]) hat neuerdings eine derartige zweite Flockungszone bei der Wechselwirkung zwischen sauren Goldsolen und Serum festgestellt und dieselbe als ein um den isoelektrischen Punkt herum beschränktes Gebiet der Fällung von Eiweiß angesprochen. Es ist zu betonen, daß ein beständiges Eisenoxydsol stets sauer genug ist.

Wenden wir uns nun der Wechselwirkung vom Fe_2O_3-Sol mit dem Immunglobulin zu. Aus dem Vergleich der diesbezüglichen Kurven (Abb. 2, *B*) mit den obigen, das Verhalten des Gemisches vom Fe_2O_3-Sol mit n Globulin darstellenden (Abb. 2, *A*) ergibt sich folgendes:

Was zuerst die linken Kurven betrifft, so liegen die Gipfel derselben bei 50 und 100 Millimol NaCl höher als es für das n Globulin der Fall ist. Demzufolge liegen auch die entsprechenden Punkte beider Äste etwas höher. Anders ausgedrückt, das Immunglobulin sensibilisiert stärker als das Globulin aus einem n Serum. Doch ist dieser Unterschied, worauf noch zurückzukommen sein wird, unbeträchtlich. Es ist aber besonders darauf Rücksicht zu nehmen, daß die Gipfel der Kurven denselben gegenseitigen Mengenverhältnissen beider Sole (13,49 Proz. Eiweiß, 86,51 Proz. Fe_2O_3) entsprechen, wie beim Vermengen des Fe_2O_3-Sols mit n Globulin.

Was nun den rechten Ast der linken Kurve betrifft, so scheint derselbe ebenfalls höher und nach rechts viel weiter ausgedehnt zu sein, als beim Globulin aus n Serum. Dementsprechend *schützt das Pseudoglobulin aus Antidiphtherieserum das Fe_2O_3-Sol schwächer als das Pseudoglobulin aus Normalserum.* Der fragliche Unterschied ist, wie aus der Abb. 2 ersichtlich, bedeutender als der Unterschied im Sensibilisierungsvermögen.

Es ergibt sich also, daß hinsichtlich der Verhältnisse in der linken Flockungszone das aus dem Antidiphtherieserum stammende Pseudoglobulin sich ebenso vom Pseudoglobulin aus Normalserum unterscheidet, wie in den Gemischen mit Berlinerblausolen.

Anders als beim n Globulin liegen ferner die Verhältnisse in der zweiten (rechten) Flockungszone. Wohl wird das hier entstandene Koagulum ebenfalls durch Kochsalz peptisiert, doch scheint das fragliche Peptisieren viel schwerer vor sich zu gehen. Ein völliges Auflösen des Koagulums tritt nämlich erst in einer 1000 Millimol im Liter enthaltenden NaCl-Lösung auf, während es beim n Globulin bereits bei 350 Millimol geschieht. Demzufolge sind auch die den niedrigeren Salzkonzentrationen entsprechenden Kurven

---

[1]) Diese Zeitschr. 159, 311, 1925.

höher, als beim n Globulin. Meines Erachtens scheint es nicht ausgeschlossen zu sein, daß die schwerere Peptisierbarkeit des Koagulums im entsprechenden Gebiete ebenfalls von der Zunahme der hydrophoben Eigenschaften bei der Immunisierung abhängt. (Meine Beobachtungen bezüglich des Verhaltens eines Fe_2O_3-Albuminsols zeigten, daß hier das Koagulum noch leichter peptisiert wird, als im Fe_2O_3-Normalglobulinsol. Das Albumin hat aber einen ausgesprochen stärkeren hydrophilen Charakter als das Globulin.)

Der Vergleich sämtlicher auf Abb. 2 zusammengestellten Kurven zeigt nun, daß in der zweiten (rechten) Zone die Unterschiede zwischen Pseudoglobulinen aus n Serum und Antidiphtherieserum viel prägnanter sind als in der Zone der typischen Wechselwirkung. Betrachten wir nun sämtliche bereits geschilderten Erscheinungen vom Standpunkt der Verringerung der Beständigkeit des Fe_2O_3-Sols (Sensibilisierung!) durch Globulin, unabhängig davon, mit welcher Art von Erscheinungen wir es hier in Wirklichkeit zu tun haben, so ergibt sich folgendes: in der zweiten (rechten) Flockungszone wird das Fe_2O_3-Sol durch beide Pseudoglobuline viel stärker sensibilisiert als in der ersten (linken), falls man das Solgemisch mit kleinen Salzkonzentrationen behandelt; im fraglichen Salzkonzentrationsgebiet sensibilisiert das Pseudoglobulin aus Antidiphtherieserum bedeutend stärker als das n Globulin. In der ersten (linken) Zone dagegen treten die Unterschiede zwischen beiden Pseudoglobulinarten, was das Sensibilisierungsvermögen betrifft, wie bereits erwähnt, nicht so scharf auf.

Die von *Freundlich* und *Beck* (l. c.) aufgestellten Versuche bezüglich der Sensibilisierung vom Fe_2O_3-Sol durch Pseudoglobuline aus normalem und antitoxischem Serum zeigten nämlich, daß bei Anwendung von kleinen Eiweißkonzentrationen (0,1 Proz.) kein Unterschied im Sensibilisierungsvermögen beider Globuline auftritt; diesen Unterschied gelang es nachzuweisen, wenn die Globulinsole ziemlich konzentriert waren (0,6 Proz.). Die Versuchsprotokolle von *Freundlich* und *Beck* erlauben die Mengenverhältnisse der Komponenten ihrer Gemische auszurechnen: im Falle der geringen Globulinkonzentration (0,1 Proz.) handelt es sich um ein Gemisch, welches 84,57 Proz. Fe_2O_3 und 15,43 Proz. Globulin enthält. Diese Mengenverhältnisse müssen aber im Bereich der ersten (linken) Flockungszone liegen. Wurde ein 0,6 proz. Globulinsol verwendet, so betrug der Gehalt des Gemisches an Globulin 92,59 Proz., an Eisenoxyd aber 7,41 Proz. Unzweifelhaft ist es das Gebiet der zweiten (rechten) Flockungszone. Tatsächlich konnten *Freundlich* und *Beck* bei Anwendung von hohen Kochsalzkonzentrationen eine erneute Peptisation feststellen, was in der fraglichen Zone allein zustande zu kommen vermag. Es liegt also auf der Hand, daß in den zwei von *Freundlich* und *Beck* untersuchten Fällen ganz verschiedene Erscheinungen auftraten.

Zum Schluß sei mir gestattet, Herrn Prof. *N. N. Andrejew*, unter dessen Leitung meine Untersuchungen ausgeführt wurden, meinen tiefsten Dank zu sagen.

Zusammenfassung.

1. Bei der Wechselwirkung zwischen Pseudoglobulinen aus normalem und Antidiphtherieserum und dem Berlinerblausol tritt bei Zusatz von Kochsalz eine Flockungszone auf, welche graphisch durch

eine eingipflige Kurve dargestellt werden kann. Der eine Ast der Kurve stellt die Sensibilisierung von Berlinerblausol durch Globulin dar, der andere umgekehrt die Sensibilisierung von Globulin durch Berlinerblau.

2. Das aus einem Antidiphtherieserum stammende Pseudoglobulin scheint in höherem Grade hydrophob zu sein als das aus einem Normalserum gewonnene. Demzufolge sensibilisiert ersteres das Berlinerblausol stärker, schützt es aber vor Elektrolytfällung schwächer.

3. Bei der Wechselwirkung zwischen dem Eisenoxydsol und dem Pseudoglobulin treten zwei Flockungszonen auf, von denen die im Gebiete niedriger Eiweißkonzentrationen liegende der Flockungszone des Berlinerblau-Globulinsols entspricht; die andere Zone, welche den hohen Globulinkonzentrationen entspricht, tritt als Ergebnis anderer Faktoren auf.

4. Die sich in der ersten Zone äußernden Unterschiede zwischen Normal- und Immunglobulin knüpfen an jene im Berlinerblau-Globulinsol auftretenden eng an. Was das Sensibilisierungsvermögen betrifft, so ist der Unterschied in der fraglichen Zone unbeträchtlich.

5. Die in der zweiten Zone auftretenden Unterschiede scheinen viel größer zu sein, indem sie sich in der leichteren Peptisierbarkeit des Koagulums im Falle des Normalglobulins äußern. Äußerlich scheint es, daß in diesem Gebiete die Sensibilisierung des Eisenoxydsols durch Immunglobulin viel stärker ausgeprägt ist.

Über Atmung und Kohlehydratumsatz tierischer Gewebe[1].

I. Mitteilung:

Milchsäurebildung und Milchsäureschwund in tierischen Geweben.

Von

O. Meyerhof und **K. Lohmann.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 19. März 1926.)

Inhaltsübersicht.

Im folgenden sollen in einer Reihe von Arbeiten Ergebnisse mitgeteilt werden, die über den Zusammenhang der Atmung mit dem Kohlehydratumsatz in verschiedenen tierischen Geweben, in der Hauptsache von Ratten, erhalten wurden. Dieser Zusammenhang ist, wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, komplexer Natur. Denn die Gewebe können Kohlehydrat auf zwei Wegen zerstören: 1. durch Oxydation; 2. durch anoxydative Spaltung zu Milchsäure. Diese beiden Mechanismen sind aber dadurch untereinander verknüpft, daß durch die Oxydation des Kohlehydrats und eventuell auch anderer

[1]) Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft ausgeführt, der auch hier für ihre Hilfe gedankt sei.

Nährstoffe die Spaltung rückgängig gemacht wird, derart, daß der Verbrauch von 1 Mol. Sauerstoff die Abspaltung von 1 bis 2 Mol. Milchsäure zum Verschwinden bringt. Es ist zunächst für den Muskel gezeigt worden, daß es sich hier um eine wirkliche Rückgängigmachung der Milchsäurebildung handelt, indem sowohl die physiologisch entstandene als auch von außen zugesetzte Milchsäure unter Verbrauch einer bestimmten Menge Sauerstoff zu Glykogen aufgebaut wird[1]). Für andere Gewebe konnte der Kreislauf der Milchsäure nur nach Analogie gefolgert werden. Die zahlenmäßige Übereinstimmung des Oxydationsquotienten $\frac{\text{Mol. rückgängig gemachter Spaltungsumsatz}}{\text{Mol. Oxydationsumsatz}}$ und die Allgemeingültigkeit des Zusammenhangs, der außer für die Milchsäurespaltung auch für die alkoholische Gärung des Zuckers zutrifft[2]), legt eine solche Verallgemeinerung nahe.

Wir haben im folgenden untersucht, wie weit sich dieser Zusammenhang von Oxydation und Spaltung auch für andere Gewebe beweisen läßt, nachdem *Warburg*, *Posener* und *Negelein*[3]) gezeigt hatten, daß allgemein die unter anaeroben Bedingungen erfolgende Glykolyse des Zuckers zu Milchsäure in Sauerstoff in dem vom Oxydationsquotienten geforderten Umfang unterdrückt wird. In der oben zitierten früheren Arbeit[4]) wurde bereits über den Kohlehydratumsatz von Zwerchfell- und Leberschnitten von Ratten berichtet, doch wurden direkte Kohlehydratbestimmungen nur in einigen orientierenden Versuchen angestellt. Weiterhin wurden von *R. Loebel*[5]) für einzelne Gewebe (graue Substanz des Rattenhirns, wachsendes Epithel, Froschrückenmark) Atmung und Glykolyse im Vergleich zum Muskel untersucht, insbesondere auch die Atmung unter dem Einfluß des Lactats studiert. Die gegenwärtigen Arbeiten knüpfen an diese Untersuchungen an. Wir berichten zunächst über die von uns verwandten Methoden, teils manometrische, die sich an die aus dem Laboratorium von *O. Warburg* beschriebenen anlehnen, zur Messung von Sauerstoffverbrauch, Kohlensäurebildung, Milchsäurebildung und Milchsäureschwund, teils mikrochemische, um in Gewebsschnitten, die zur Atmungsmessung gedient hatten, Kohlehydrat und eventuell auch Milchsäure zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit teilen wir nur die Ergebnisse der manometrischen Messungen mit, insbesondere über den Einfluß der Milchsäure auf die Atmungsgröße der verschiedenen Gewebe, über den

---

[1]) *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.
[2]) *O. Meyerhof*, ebendaselbst **162**, 43, 1925.
[3]) *Warburg*, *Posener* und *Negelein*, ebendaselbst **152**, 309, 1924.
[4]) *O. Meyerhof*, *K. Lohmann*, *R. Meier*, l. c.
[5]) *R. Loebel*, diese Zeitschr. **161**, 219, 1925.

oxydativen Schwund der Milchsäure dabei und das Verhältnis von Milchsäurebildung und Milchsäureverbrauch unter der Einwirkung verschiedener Faktoren. Dabei wird durch diese und die folgenden Arbeiten die Auffassung zu stützen versucht, *daß während der Atmung in Gegenwart von Zucker die Milchsäure einen Kreislauf durchmacht, und daß die voneinander unabhängig beeinflußbare Geschwindigkeit der beiden Stoffwechselphasen bestimmt, ob die Spaltung oder die Synthese überwiegt, so daß entweder Milchsäure entsteht oder verschwindet.*

I. Spaltung
Hexose ⇄ 2 Milchsäure
II. Synthese

I. Methoden.

a) Manometrische Methoden.

Die von *O. Warburg* und seinen Mitarbeitern beschriebenen manometrischen Methoden[1]) zur Messung des Sauerstoffverbrauchs, der Kohlensäurebildung und der Milchsäurebildung von überlebenden Warmblütergeweben in Ringerlösung und Serum haben wir außer zu den von den Autoren selbst angegebenen Zwecken auch zur Bestimmung des Verbrauchs der Milchsäure durch tierische Gewebe angewandt. In der „verbesserten Methode zur Messung von Atmung und Glykolyse" (Kästchenmethode) von *Warburg* wird die Milchsäure*bildung* neben der Atmungskohlensäure bestimmt durch Messung des gesamten in Gegenwart von Zucker und Bicarbonat in den Gasraum übertretenden Kohlendioxyds, wobei in Sauerstoff ein dem verbrauchten Sauerstoff gleiches Volumen CO_2 auf Atmungskohlensäure verrechnet wird, der Überschuß auf Milchsäure. Kennt man den respiratorischen Quotienten des Gewebes unter den Versuchsbedingungen genauer, so kann man die diesem Quotienten entsprechende Atmungskohlensäure in Abzug bringen. Der „scheinbare respiratorische Quotient" (γ)

$$\frac{\text{Kohlensäure} + \text{Milchsäure}}{\text{Sauerstoff}}$$

ist dann stets größer als der wahre respiratorische Quotient und meist über 1. Befindet sich aber in der Lösung das Alkalisalz einer organischen Säure, wie Milchsäure, und verschwindet diese Säure durch Oxydation oder Synthese, so bleibt Alkali zurück und retiniert Kohlensäure. Der scheinbare respiratorische Quotient γ ist in diesem Falle kleiner als der wahre. Aus der *Verkleinerung* des Quotienten kann man die Menge *verbrauchter* Milchsäure ebenso berechnen, wie aus der *Vergrößerung* des Quotienten die *gebildete* Milchsäure.

---

[1]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 1923; **152**, 51, 1924; **158**, 121, 1925; **164**, 481, 1925.

Noch genauer und ohne daß der wahre respiratorische Quotient bekannt zu sein braucht, ergibt sich der Verbrauch der Milchsäure aus der Zunahme des Bicarbonatgehalts der Lösung. Diese Methode entspricht der von *E. Negelein* beschriebenen[1]), in der aus der *Verringerung* des Bicarbonats die Glykolyse berechnet wird. Wird Milchsäure in einer bicarbonathaltigen, mit 5 Proz. CO_2 im Gleichgewicht befindlichen Lösung verbraucht, so wird für jedes verschwindende Molekül Milchsäure ein Molekül Kohlensäure retiniert. Bestimmt man daher zu Beginn und zum Schluß durch Einkippen eines Überschusses starker Säure, z. B. Salzsäure, den Bicarbonatgehalt, so ergibt sich aus der Zunahme des Bicarbonats direkt die verschwundene Milchsäure. Hierbei entspricht 1 cmm Kohlensäure ebenso wie bei der Glykolysemessung 0,004 mg Milchsäure. Der Milchsäureschwund wird von uns dabei durch den Stoffwechselquotienten $Q^B_{(M)}$ (Kubikmillimeter Bicarbonatzunahme pro Milligramm Trockengewicht und Stunde) ausgedrückt, während Q_M nach dem Vorschlag von *O. Warburg* Kubikmillimeter durch Milchsäure ausgetriebene Kohlensäure pro Milligramm und Stunde bedeutet. In Zahlen ist daher $Q^B_{(M)} = -Q_M$. In gleicher Weise lassen sich diese Verfahren auch zur Messung der in Serum verschwindenden Milchsäure anwenden, wobei man bei Verwendung der „Kästchenmethode" sich der von *Warburg* angegebenen Vorschriften bedient. Man berechnet hier die pro Millimeter Druckzunahme (Δp) erfolgende mittlere Retention des CO_2 (Δu) nach der von *Warburg* für Kohlensäure angegebenen Formel $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right) C$, wenn in dem Versuch Milchsäure *verschwindet*. Sowohl der Milchsäureschwund wie die Milchsäurebildung wird durch Vergleich der manometrischen mit chemischen Methoden kontrolliert. Die im folgenden benutzten Bezeichnungen entsprechen den von *Warburg* angegebenen.

Will man im gleichen Versuch Atmung und Kohlehydratumsatz bestimmen, so lassen sich diese komplizierteren Methoden der Atmungsmessung nicht anwenden. Das gilt besonders, wenn die Atmung in Serum gemessen wird, weil die Zuckermenge in mehreren Kubikzentimetern Serum, wie sie in diesen Methoden erfordert werden, für die Messung des Kohlehydratumsatzes zu groß ist. In diesem Falle muß man sich der älteren Methoden bedienen, in denen die aus dem Gasraum ausgetretene Kohlensäure durch Kalilauge absorbiert wird. Um zu verhindern, daß hier in mehrstündigen Versuchen die Suspensionslösung alkalisch wird, wurde, bei Verwendung von Ringerlösung, isotonisches Phosphatgemisch von p_H 7,4 im Verhältnis 1 : 20 statt

---

[1]) *Negelein*, diese Zeitschr. 158, 121, 1925.

Bicarbonat hinzugefügt. Bei Versuchen in Serum wurde dieses zunächst zur Entfernung der Hauptmenge Bicarbonat angesäuert, meist mit 1,5 ccm n/10 HCl zu 10 ccm inaktiviertem Pferdeserum, und im Anschluß daran längere Zeit evakuiert. Dies bicarbonatarme, kohlensäurefreie Serum hat eine Wasserstoffzahl von etwa 8,0, die sich in mehrstündigem Atmungsversuch bis etwa 8,5 verschieben kann. Wenn auch dies Verfahren zur Messung der absoluten Atmungsgröße hinter denen bei physiologischen Kohlensäuredrucken an Exaktheit zurücksteht, ist es doch zum Vergleich von Kohlenhydratumsatz und Sauerstoffverbrauch verwendbar. Ebenso kann es zur Bestimmung des wahren respiratorischen Quotienten im Serum dienen, indem man denselben aus drei Messungen ermittelt (Sauerstoffverbrauch; Bicarbonatgehalt vorher; Bicarbonatgehalt nachher + in der Versuchszeit in den Gasraum abgegebener Kohlensäure).

b) *Mikrochemische Methoden.*

Kohlehydratbestimmung.

Prinzip: Das Gewebsstück wird in Alkohol getötet. In dem alkoholischen Auszug werden die niederen Kohlehydrate, im Rückstand das Glykogen bestimmt, in der Regel gemeinsam, nachdem die beiden Anteile wieder vereinigt sind. Als Zuckerbestimmung dient die Methode von *Hagedorn-Jensen*, für deren fehlerlose Durchführung eine vollkommene Eiweißfreiheit der zu hydrolysierenden Lösungen erforderlich ist.

Ausführung: Die Schnitte von etwa 20 bis 30 mg Feuchtgewicht — vor dem Versuch auf einer Torsionswage von *Hartmann* und *Braun* gewogen — werden in einer kleinen, eisgekühlten Reibschale in 1 ccm 96proz. Alkohol zerrieben, dann mit der Suspensionslösung und Spülflüssigkeit in ein kleines Reagenzglas umgefüllt, so daß sie in 4 bis 5 ccm 66proz. Alkohols suspendiert sind, und über Nacht stehengelassen. Sie werden zweimal auf der Zentrifuge mit derselben Menge 66proz. Alkohols gewaschen, wobei der Gewebsrückstand jedesmal etwa eine Stunde mit Alkohol stehen bleibt. Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden auf dem Wasserbade eingeengt, im Trockenschrank bei 50° völlig getrocknet; es wird mit 3 ccm Wasser aufgenommen, mit je 1 ccm 0,15 n NaOH und 3,4proz. $ZnSO_4$ versetzt, nach Umfüllen in ein schmales Reagenzglas 3 Minuten im siedenden Wasserbade erwärmt, die Lösung durch ein Asbestfilter in der Zentrifuge filtriert und dann von dem Filtrat ein aliquoter Teil, etwa 4 ccm, entweder für sich oder nach Vereinigung mit einem entsprechenden aliquoten Teil des Glykogens in Salzsäure hydrolysiert.

Der zurückgebliebene Gewebsrückstand wird mit 0,3 bis 0,4 ccm 40proz. KOH nach *Pflüger* 2 Stunden im Wasserbade zerkocht; nach Zusatz von 0,5 ccm Wasser und 2 ccm 96proz. Alkohols wird über Nacht stehengelassen. Das ausgefällte Glykogen wird auf der Zentrifuge je einmal mit 3 bis 4 ccm 66-, 80-, 96proz. Alkohol und einmal mit Äther gewaschen. Der trockene Rückstand wird mit 2,5 ccm Wasser schwach erwärmt, die Flüssigkeit durch Asbest abzentrifugiert und von dem Filtrat ein aliquoter

Teil (in der Regel wie in der Bestimmung der niederen Kohlehydrate 80 Proz. der Gesamtmenge) hydrolysiert.

Zur Hydrolyse verwenden wir nicht zu weite Reagenzgläser aus Jenaer Glas, die mit einer Glaskappe versehen werden, um das Einengen zu vermeiden. Die Flüssigkeit, mit dem zehnten Teil ihres Volumens 25proz. Salzsäure (für forensische Zwecke) versetzt, wird 3 Stunden im Wasserbade erhitzt. Der Inhalt wird mit 3 ccm Wasser in ein weiteres Reagenzglas überspült, mit einem Tropfen stark verdünnten Phenolphthaleins versetzt und genau neutralisiert (mit 40 Proz. KOH und n HCl); dann nach Auffüllen auf 10 ccm mit 5 ccm der soda-alkalischen Lösung von Kaliumferricyanid versetzt und nach der Vorschrift von *Hagedorn-Jensen* 15 Minuten im Wasserbade erwärmt. Die abgekühlte Lösung wird aus dem Reagenzglas mit 8 ccm der NaCl—$ZnSO_4$—KJ-Lösung und 5 ccm der 3proz. Essigsäure (entsprechend den Vorschriften der Methode) in ein Becherglas übergespült und das ausgeschiedene Jod mit n/200 Thiosulfat zurücktitriert. Der Titer der Thiosulfatlösung wird mit bekannten Glucosemengen, die ebenfalls 3 Stunden in Salzsäure erhitzt und genau wie die Versuchslösungen vorbehandelt sind, eingestellt. Ebenso wird der Blindwert aus Wasser, das mit verdünnter Salzsäure erwärmt und dann neutralisiert ist, erhalten. Dieser Wert weicht um etwa 0,05 bis 0,06 ccm n/200 Thiosulfat von dem direkt bestimmten Werte ab. Innerhalb der Grenzen von 0,1 bis 0,7 mg reduzierbarer Kohlehydrate war der Reduktionsfaktor gleich. Alle Titrationen geschahen mit *Bang*schen Mikrobüretten, die 10 ccm faßten. Bei Verarbeitung von Serum wurde genau so verfahren. Außerdem wurde in diesem Falle der Zuckergehalt des Serums für sich sowie nach Hydrolyse bestimmt. Der auf die letztere Weise gefundene Wert ist stets etwas höher und war für die Berechnung zu benutzen, da in den in Serum atmenden Gewebsschnitten das veratmete hydrolysierbare Kohlehydrat zu bestimmen war. Eine Übersicht über die Kontrollbestimmungen an Froschmuskeln gibt die Tabelle I (Vergleich mit der früheren Verarbeitungsart und Bestimmung des Zuckers nach *Bertrand*).

Tabelle I.

		Makrobestimmung (*Bertrand*)			Mikrobestimmung (*Hagedorn*)		
		Muskelgewicht g	Zucker mg	Zucker Proz.	Muskelgewicht g	Zucker mg	Zucker Proz.
Glykogen	1	1,82	9,1	*0,50*	0,090	0,461	*0,51*
	2	1,45	12,45	*0,86*	0,043	0,357	*0,82*
Niedere Kohlehydrate	3a	2,35	6,26	*0,27*	0,064	0,19	*0,295*
	3b	—	—	—	0,076	0,23	*0,30*
	3c	—	—	—	0,074	0,22	*0,30*

Die chemischen Milchsäurebestimmungen entsprachen den bisher beschriebenen[1]). Die Enteiweißung geschah nach *Schenck* oder *Folin-Wu*, woran die *van Slyke*sche Entzuckerung mit Kupferkalk an-

[1]) Pflügers Arch. **204**, 295, 1924; diese Zeitschr. **168**, 136ff., 1926.

geschlossen wurde. Neben der Titration des freien Bisulfits wurde zur Kontrolle das an Aldehyd gebundene nach der Vorschrift von *Clausen* durch Zugabe eines Überschusses von Natriumbicarbonat bestimmt.

II. Atmung und Milchsäureumsatz von Rattengeweben.

Für die meisten Gewebe ernährter Ratten in traubenzuckerhaltiger Ringerlösung sind von *O. Warburg*, *Negelein* und *Posener* die durchschnittlichen Atmungsgrößen (Q_{O_2} = Kubikmillimeter Sauerstoff pro Milligramm Trockengewicht und Stunde) angegeben. Bestimmt man die Atmung ohne Zucker, so zeigen für die Anfangszeit (½ bis 1 Stunde) die meisten Gewebe keine große Abweichung von diesen Werten wegen ihres Vorrats an oxydierbarer Substanz; erst im Laufe einiger Stunden nimmt die Atmung erheblich ab. Den Atmungsabfall der Gewebe in zuckerfreier Lösung kann man erhöhen, wenn man die Ratten 24 bis 48 Stunden vor dem Versuch hungern läßt. Die Benutzung von Hungerratten empfiehlt sich daher, wenn man von zugesetzten Stoffen feststellen will, ob sie die Atmung des Gewebes beeinflussen bzw. selbst oxydiert werden. Aus diesem Grunde wurden die meisten unserer Versuche mit Hungerratten angestellt.

a) Atmung und Milchsäureumsatz des Lebergewebes.

Bereits früher ist gezeigt worden[1]), daß die Atmungsgröße des Lebergewebes von Hungerratten durch Zusatz von Milchsäure stark erhöht wird, und zwar hatte sich im Durchschnitt in Ringerlösung ohne Zusatz ein Q_{O_2}-Wert von 7,8, in Ringerlösung + milchsaurem Natrium ein solcher von 12,3 ergeben. Die relative und absolute Steigerung der Atmung wird aber noch größer, wenn man die Ratten nicht wie in diesen früheren Versuchen 2 bis 3 Tage, sondern nur 16 bis 36 Stunden, durchschnittlich 24 Stunden, hungern läßt. Die Atmung in Ringerlösung ohne Zusatz und mit Glucose ist dann für die erste Stunde etwa gleich und besitzt einen Q_{O_2}-Wert von 9 bis 13; durch n/50 Lactat wird sie um 50 bis 100 Proz. gesteigert, auf 15 bis 23. Bei ernährten Ratten ist diese Steigerung geringer und fehlt öfters ganz. Einige Beispiele sind in der Tabelle II enthalten.

Diese Atmungssteigerung geht nun mit einem Verbrauch an Milchsäure einher, meßbar an der Einsparung von Bicarbonat. In zuckerhaltiger Ringerlösung zeigen Leberzellen auch in Sauerstoff eine geringfügige Glykolyse. Als Durchschnittswert derselben ($Q_M^{(O_2)}$) geben *Warburg*, *Negelein* und *Posener* + 0,6[2]) an. Gerade bei der Leber ändert die

---

[1]) *O. Meyerhof*, *K. Lohmann*, *R. Meier*, l. c.

[2]) *Warburg*, *Negelein* und *Posener*, diese Zeitschr. 152, 329, 1924.

Tabelle II.

Steigerung der Atmungsgröße des Lebergewebes durch Milchsäure.

Nr.	Datum	Hungerzeit Stunden	Versuchszeit Stunden	Q_{O_2} ohne Zusatz	Q_{O_2} mit Traubenzucker	Q_{O_2} mit Milchsäure	Steigerung durch Milchsäure Proz.
1	16. VII.	nicht hungernd	1	—	12,5	11,5	0
2	2. XII.	24	2	10,8	10,8	17,9	66
3	3. XII.	16	2	—	13,2	18,4	40
4	4. XII.	24	$1^1/_2$	—	9,6	22,9	130
5	14. XII.	36	1	11,2	11,1	17,0	55
6	18. XII.	16	$2^1/_2$	8,2	9,3	14,5	75
7	12. II.	24	1	8,85	—	15,1	70

Weglassung des Zuckers hieran wenig, denn das Glykogen der Leberschnitte wird rasch zu Zucker hydrolysiert. Andererseits ist allerdings die Glykolyse in Hungerlebern noch kleiner. Setzt man aber Lactat zu der Ringerlösung hinzu, so tritt an Stelle der Milchsäure*bildung* ein Milchsäure*schwund*. Diese Verschiebung ist bereits im Lebergewebe ernährter Ratten in zuckerhaltiger Lösung festzustellen. Erheblich größer aber ist dieser Milchsäureschwund bei hungernden Ratten, da offenbar wegen des geringeren Glykogenvorrats die Tendenz zum Kohlehydrataufbau verstärkt ist. Dies Überwiegen der Synthese ist mit den oben angegebenen Methoden leicht festzustellen. Der echte respiratorische Quotient für die Warmblüterleber in Ringerlösung ist 0,8 bis 0,85 (siehe Tabelle V). Der scheinbare respiratorische Quotient γ ergibt sich für Lebergewebe ernährter Ratten in zuckerhaltiger Ringerlösung zu etwa 1,1. Die Spaltung überwiegt; dagegen nach einem Zusatz von n/50 bis n/100 Lactat zu zuckerhaltiger Ringerlösung nur zu 0,85. Spaltung und Synthese heben sich gerade auf. Im Lebergewebe hungernder Ratten aber wird dieser Quotient noch kleiner und beträgt in Gegenwart von Lactat nur noch 0,2 bis 0,3.

Tabelle III.

Atmung und scheinbarer respiratorischer Quotient (γ) des Lebergewebes in zucker- und lactathaltiger Ringerlösung.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratte Stunden	Zusätze zur Ringerlösung	Versuchszeit Minuten	γ	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$
1	16. VII.	0	0,05 Proz. Glucose	60	1,10	12,5	2,0
1a	16. VII.	0	0,05 Proz. Glucose + n/100 Natriumlactat	60	0,844	11,5	0
2	11. VII.	0	0,1 Proz. Glucose	60	1,15	10,6	1,5
3	14. VII.	24	0,1 Proz. Glucose	60	0,74	10,0	0
4	10. II.	24	0,1 Proz. Glucose + n/100 Natriumlactat	60	0,31	14,5	—
5	10. II.	24	0,1 Proz. Glucose + n/100 Natriumlactat	40	0,18	12,1	—
6	12. II.	24	0,1 Proz. Glucose	40	0,54	11,2	—
6a	12. II.	24	0,1 Proz. Glucose + n/200 Natriumlactat	40	0,23	10,1	—

Protokoll: Tabelle IV. Nr. 2.

Nr.	1	2	3	4	5	6
Lösung	1,5 ccm Ringer mit 0,2 Proz. Glucose und 3×10^{-3} $NaHCO_3$	Wie 1	Wie 1	1,5 ccm Ringer mit 1×10^{-2} n Natriumlactat und $1,5 \times 10^{-3}$ $NaHCO_3$	Wie 4	Wie 4
Schnittgewicht (feucht) in mg . .	kein Schnitt	26,6	28,2	kein Schnitt	26,8	32,4
$t = 0$	0,2 ccm nHCl eingekippt	0,2 ccm nHCl eingekippt	—	0,2 ccm nHCl eingekippt	0,2 ccm nHCl eingekippt	
h in mm bei $t = 0$.	+ 91,5	+ 79		+ 52	+ 47,5	
h in mm bei $t = 1h30'$			(— *18*) 0,2 ccm nHCl eingekippt bei $t = 1h\ 30'$			(— *25,5*) 0,2 ccm nHCl eingekippt bei $t = 1h\ 30'$
dp (Gesamtdruckänderung)			+ 80,5			+ 68
k_{CO_2}	1,27	1,47	1,40	1,27	1,57	1,41
Kubikmillimeter CO_2 aus Bicarbonat	116	117 für 3 berechnet 117	112,5	66	74,6 für 6 berechnet 76,4	96
Änderung des Bicarbonatgehalts . . .			— *4,5*			+ *19,6*
$Q^B_{(M)}$			— 0,54			+ 2,02

Noch direkter finden wir diesen Milchsäureschwund durch Bestimmung der Bicarbonatzunahme. Als Beispiel sei das Protokoll eines Versuchs angegeben und in der Tabelle IV eine Zusammenstellung der Resultate.

Tabelle IV.

Lactatverbrauch der Leber, gemessen an der Zunahme des Bicarbonats.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratten	Versuchszeit	Bicarbonatänderung ohne Zusatz	Bicarbonatänderung mit Glucose $Q^B_{(M)}$	Bicarbonatänderung mit Lactat $Q^B_{(M)}$	Q_{O_2} mit Zucker	Q_{O_2} mit Lactat
1	**25. IX.**	0	1h 15′	— 0,6	—	+ 1,15	—	—
2	**26. IX.**	24h	1 40	—	— 0,54	+ 2,02	10,2	13,2
3	**1. X.**	42	1 30	—	—	+ 2,4	—	—
4	**3. XII.**	12	2	—	—	+ 2,5	13,4	18,4
5	**3. XII.**	28	1 30	—	—	+ 3,5	9,6	22,9

Die durch Zusatz von Glucose und Lactat zur Ringerlösung hervorgerufene Änderung des Stoffwechsels erklärt bis zu einem gewissen Grade das Verhalten von Leberschnitten in Serum. Die Atmung von

Leberschnitten hungernder Ratten in Serum ist gegenüber Ringerlösung stark gesteigert, wie bereits früher erwähnt wurde[1]). Da diese älteren Versuche mit angesäuertem, ausgepumptem Serum angestellt sind, konnte der Einwand erhoben werden, daß die Atmungsgröße hier abnorm sei. Jedoch lassen sich diese Resultate mit der neuen von *O. Warburg* beschriebenen Methode zur Messung von Atmung und Glykolyse in Serum bestätigen. Im Gegensatz zu anderen Geweben zeigen auch hier die Leberschnitte von Hungerratten eine Atmungssteigerung von 50 bis 100 Proz. gegenüber traubenzuckerhaltiger Ringerlösung. Nun enthält das Serum stets neben Traubenzucker auch Milchsäure, und zwar in Mengen von 0,5 bis 1 mg pro Kubikzentimeter je nach Art der Herstellung. Hauptsächlich ist also die Atmungssteigerung auf die Anwesenheit der Milchsäure zu beziehen, wobei gleichzeitige Anwesenheit von Glucose und Lactat besonders günstig zu sein scheint. In der Tat beobachtet man unter diesen Umständen ein starkes Verschwinden von Milchsäure, erkenntlich in der Kästchenmethode an der Verringerung des scheinbaren respiratorischen Quotienten, der weit unter 0,8 liegt. Gleichwohl aber ist dieser Umsatz der Milchsäure nicht die alleinige Ursache für die Atmungssteigerung und die auffallend niedrigen scheinbaren Quotienten der Hungerlebern in Serum. Denn auch für den echten respiratorischen Quotienten in angesäuertem Serum findet man unter den gleichen Umständen niedrigere Werte als im Lebergewebe ernährter Ratten oder als mit Hungerlebern in Ringerlösung, nämlich 0,45 bis 0,70, statt in den anderen Fällen 0,70 bis 0,85 (s. Tabelle V).

Tabelle V.

Echter respiratorischer Quotient des Lebergewebes hungernder Ratten.

Nr.	Datum	Hungerzeit	Suspensionslösung	Versuchszeit	QO_2	Resp. Quot.
1	28. VII.	24h	Ringerlösung + Zucker	1h30'	8,1	0,84
2	31. VII.	24	Ringerlösung + 0,01 n Natriumlactat	1 30	12,3	0,715
3	31. VII.	0	Serum	1	12,2	0,77
4	28. VII.	24	Serum + 0,16 proz. Zucker	1 30	14,7	0,58
5	27. VII.	24	Serum	1 30	16,8	0,48
5a	27. VII.	24	Serum + Insulin	1 30	14,4	0,45
6	9. VII.	36	Serum + Insulin	2 30	19,1	0,64
7	29. VII.	36	Serum + 0,02 proz. Zucker	1	19,2	0,45
8	18. IX.	24	Serum	1 30	22	0,76
9	17. X.	24	Serum	2	13	0,67
9a	17. X.	24	Serum + Insulin	2	16,7	0,715

[1]) *O. Meyerhof, K. Lohmann, R. Meier,* l. c.

Hiernach scheint in diesen Fällen noch ein besonderer Sauerstoffverbrauch stattzufinden, der nicht zur Kohlensäurebildung führt, der aber auch nicht auf die Bildung von Kohlehydrat aus Eiweiß oder Fett zu beziehen ist. Indessen darf man doch die wesentlichen Erscheinungen bei der Atmung von Hungerlebern in Serum, nämlich die Steigerung der Atmung und die besonders starke Herabsetzung des scheinbaren respiratorischen Quotienten (γ) durch die Umwandlung von Milchsäure in Kohlehydrat erklären (vgl. auch die folgende Arbeit von *Takane*). Damit stimmt überein, daß sowohl die Atmungssteigerung wie die Verkleinerung des γ beim Lebergewebe ernährter Ratten meist geringer ist. Als Beispiel sei ein Protokoll gegeben und die Versuche in der Tabelle VI, A und B zusammengestellt.

Protokoll: Tabelle VI. B. 4.

Bicarbonatgehalt pro 1 ccm Serum mit 9 : 1 Ringer verdünnt = 443 cmm CO_2, Kohlensäuredruck = 460 mm Brodielösung.

$$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0{,}105 \text{ pro 1 ccm verdünntes Serum.}$$

	Leberschnitte von Hungerratten von 48 Stunden	
	(1)	(2)
v_F (Serumvol.)	2,0	7,0
v_G (Vol. des Gasraums)	12,24	7,61
k_{O_2}	1,082	0,687
k_{CO_2} für Serum	1,40	1,797
h nach 20 Minuten	— 19	— 37,5
h „ 40 „	— 38,3	— 77,5
h „ 60 „	— 58,8	— 116,5
mg Trockengewicht	4,61	4,58
h in 60 Minuten, berechnet für (2)	— 59,2	— 116,5

$$\frac{k_1CO_2 \cdot k_2CO_2}{k_1O_2 \cdot k_2O_2} = 3{,}39.$$

$$\gamma = 3{,}39 \cdot \frac{16}{126{,}7} = 0{,}428$$

$$x_{O_2} \text{ [für (2) berechnet]} = H \cdot \frac{1{,}235}{1{,}797 - \gamma \cdot 0{,}687} = 116{,}5 \cdot 0{,}822 = 95{,}8 \text{ cmm } O_2.$$

$$Q_{O_2} \; 20{,}9$$
$$Q_{CO_2} \; 8{,}94.$$

Tabelle VI.

Atmungsgröße und scheinbarer respiratorischer Quotient des Lebergewebes ernährter und hungernder Ratten in Serum.

A. Ernährte Ratten.

Nr.	Datum	Versuchszeit	g Insulin pro ccm	γ	Q_{O_2}
1	20. VI.	1h	—	1,0	11,7
2	23. VI.	1	—	0,54	15,7
3	27. VI.	1	—	0,71	15,15
3a	27. VI.	1	$8 . 10^{-6}$	0,60	15,4
4	29. VI.	40′	—	0,465	14,6
4a	29. VI.	40	$3 . 10^{-5}$	0,53	14,75
5	5. VII.	40	—	0,43	13,9
5a	5. VII.	40	$3 . 10^{-5}$	0,53	15,4
6	10. VII.	1	—	0,52	15,0
7	11. VII.	1	—	0,79	12,5
			Durchschnitt:	*0,61*	*14,4*

B. Hungerratten.

Nr.	Datum	Hungerzeit	Versuchszeit	g Insulin pro ccm	Milchsaurer Natriumzusatz (mol)	γ	Q_{O_2}
1	30. VI.	24h	40′	—	—	0,38	20,5
2	30. VI.	24	1h	—	—	0,485	19,9
3	7. VII.	24	1	—	—	0,35	14,1
3a	7. VII.	24	1	$1,2 . 10^{-5}$	—	0,13	13,1
4	9. VII.	48	1	—	—	0,43	20,9
5	9. VII.	48	1	—	$1,3 . 10^{-2}$	0,21	13,3
5a	9. VII.	48	1	$1,2 . 10^{-5}$	$1,3 . 10^{-2}$	0,49	19,7
6	10. VII.	24	1	$1,2 . 10^{-5}$	$1,0 . 10^{-2}$	0,02	15,0
7	15. VII.	48	1	—	—	0,31	13,6
7a	15. VII.	48	1	$1,2 . 10^{-5}$	—	0,50	18,4
8	18. VII.	24	1	$1 . 10^{-5}$	—	0,47	19,4
9*)	19. VII.	24	1	$1 . 10^{-5}$	—	0,45	16,1
9a	19. VII.	24	1	$1 . 10^{-5}$	—	0,43	16,4
					Durchschnitt:	*0,36*	*17,0*

*) Zwei verschiedene Pferdesera benutzt für 9 und 9a.

Das Serum wurde in der Regel mit einem Teile Ringerlösung auf zehn Teile Serum verdünnt, wie es auch für die Kontrollversuche zur Bestimmung der Kohlensäureretention in Serum geschah (in einzelnen Versuchen betrug die Verdünnung 1,5 Ringerlösung auf 10 Serum). In einer Reihe von Versuchen wurde Insulin zugesetzt (Insulin *Leo* in Konzentration von etwa $1 . 10^{-5}$ g im Kubikzentimeter), wodurch bei

hungernden Ratten häufig, aber nicht stets, die Atmungssteigerung noch etwas größer wurde, während bei ernährten Ratten kein Einfluß festzustellen war. Allerdings wurde auch niemals eine größere Atmungsintensität erreicht, als sie gelegentlich ohne Insulinzusatz beobachtet wurde. In Ringerlösung blieb jeder Einfluß des Insulins auf die Atmungsgröße aus.

Als Insulin wurde in der Mehrzahl der Versuche ein 1923 unter Leitung von Prof. *A. Krogh* hergestelltes Präparat von Insulin *Leo* benutzt, das eine alte Kopenhagener Einheit (= 4 alte Toronto-Einheiten)[1] in 0,27 mg besaß und seine Wirkungsstärke innerhalb zweier Jahre, wie wiederholte Bestimmungen an Ratten ergaben, nicht deutlich änderte. Später wurde gelegentlich ein zweites Präparat von Insulin *Leo*, das wir von dem Nordisk Insulinlaboratorium erhielten, verwandt, mit einer internationalen Einheit in 0,075 mg. Vergleichsweise wurde auch Insulin Organon-Oss mit einer Einheit in 0,39 mg herangezogen, doch sind alle in den Tabellen wiedergegebenen Versuche mit dem ersten Präparat ausgeführt. Herrn Prof. *A. Krogh*, Herrn Dr. *Erik Jensen*, Direktor des Nordisk Insulinlaboratoriums, sowie Herrn Dr. *Laquer*, wissenschaftlichem Leiter der Fabrik Organon, sind wir für die Überlassung der Insulinpräparate zu großem Dank verpflichtet. Da die kritische blutzuckersenkende Wirkung des ersten Insulin-*Leo*-Präparats, auf die Gewichtseinheit Kaninchen bezogen, in einer Konzentration von etwa $1 . 10^{-7}$ stattfindet, wobei jedoch vermutlich die Konzentration in einzelnen Organen viel höher ist, haben wir Konzentrationen benutzt, die ein bis zwei Zehnerpotenzen darüber lagen, in der Regel Konzentrationen zwischen $2 . 10^{-6}$ und $3 . 10^{-5}$, wobei sich keine deutlichen Unterschiede ergaben, während höhere Konzentrationen die Atmung öfters herabsetzten.

Daß in der Tat die Verkleinerung des scheinbaren respiratorischen Quotienten bei der Atmung von Hungerlebern in Serum mindestens zum Teil auf den Schwund des Lactats zurückzuführen ist, läßt sich durch Bestimmung der Bicarbonatvermehrung in Serum beweisen.

Es wird dabei, wie oben S. 384 angegeben, verfahren, mit dem Unterschied, daß die Ansäuerung nach dem Vorschlag von *Warburg* durch 0,2 ccm 8proz. Citronensäure geschieht, damit keine Gerinnung des Serums eintritt. Ferner wird nicht nur zu Anfang Sauerstoff mit 5 Proz. Kohlensäure durch das Gefäß geleitet, sondern auch am Ende der Versuchszeit, um das Serum wieder unter den anfänglichen CO_2-Druck zu setzen. Erst dann wird nach Schluß des Hahns die Säure eingekippt. Die Zunahme des Bicarbonats ist in diesem Falle nicht genau gleich der Abnahme der Milchsäure, sondern muß wegen der Anwesenheit anderer Puffersubstanzen mit dem gleichen Faktor $\frac{\Delta u}{\Delta p}$ multipliziert werden, wie bei den vorstehenden Versuchen.

Es wird jeweils 1 ccm Serum verwandt. Da dessen Bicarbonatgehalt im Vergleich zur stattfindenden Änderung hoch ist, etwa 450 cmm CO_2 bei 20 bis 40 cmm CO_2-Zunahme, ist die Genauigkeit der Methode ziemlich beschränkt.

---

[1] *S. Grevenstuck* und *Laqueur*, Ergebn. d. Physiol. **23**, II, S. 1, 1925.

Tabelle VII.

Bicarbonatzunahme in Serum bei der Atmung von Hungerlebern.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratte	Versuchszeit	Zugesetzte Insulinkonzentration in g pro ccm	mg Schnittgewicht (Trockengewicht)	Gemessene Bicarbonatänderung in cmm CO_2	Berechneter Milchsäureschwund in cmm CO_2	$Q^B_{(M)}$ in Serum
1	7. VII.	24h	1h50′	$3 \cdot 10^{-5}$	7,39	+ 47	+ 56,5	+ 4,2
2	9. VII.	48	1 20	—	6,29	+ 44	+ 53	+ 6,3
	9. VII.	48	1 20	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$	6,45	+ 31	+ 37	+ 4,4
3	10. VII.	24	1	—	4,39	+ 20	+ 24	+ 5,5
	10. VII.	24	1	$1 \cdot 10^{-5}$	5,07	+ 23	+ 28	+ 5,5
4	15. VII.	48	1	—	7,06	+ 16	+ 19	+ 2,7
	15. VII.	48	1	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$	8,25	+ 26	+ 31	+ 3,8

b) Atmung und Milchsäureumsatz im Nierengewebe.

In gleicher Weise wie bei der Leber wurde der Zusammenhang von Atmung und Milchsäureumsatz noch in einer Reihe anderer Gewebe studiert. Zum Unterschied vom Lebergewebe ist die Atmung des Nierengewebes sehr gut konstant und, soweit festgestellt, bei ernährten und Hungerratten gleich. In Zuckerlösung beträgt Q_{O_2} im Durchschnitt 21, der Wert fällt in zuckerfreier Lösung langsam ab und beträgt dann durchschnittlich in den beiden ersten Stunden 18. In Gegenwart von milchsaurem Natrium steigt die Atmung konstant auf einen Wert von 25 bis 29, also höher als in Traubenzuckerlösung, so wie es auch für Zwerchfell und Leber beschrieben wurde. Hinzuzufügen ist, daß auch in Fructoselösung die Atmung deutlich höher als in Glucose ist. In der Tabelle VII ist eine Übersicht über die Atmungsbestimmungen gegeben.

Tabelle VIII.

Atmungsgröße des Nierengewebes in zucker- und milchsäurehaltiger Ringerlösung.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratte	Versuchszeit	Q_{O_2} ohne Zusatz	Q_{O_2} mit Traubenzucker	Q_{O_2} mit milchsaurem Natrium	Q_{O_2} mit Fruchtzucker
	1925						
1	9. X.	1 Tag	1h	16,0	20,2	27,2	—
2	10. X.	0	1 30′	18,2	20,9	25,7	—
3	12. X.	0	2	17,6	21,9	—	25,4
4	3. XII.	2 Tage	1 30	21,1	23,9	—	25,1
5	4. XII.	2 „	1	18,4	20,6	29,0	—
	1926						
6	5. II.	1 Tag	40	—	18,3	29,4	—
			Durchschnitt:	*18,5*	*21,0*	*27,8*	*25,2*

Entsprechend ergibt sich ein starker Milchsäureverbrauch, der, wie bei der Leber, sowohl an der Verringerung des scheinbaren respirato-

rischen Quotienten wie an der Zunahme des Bicarbonats bestimmt werden kann. Mehrere Messungen nach dieser letzteren Methode sind in der folgenden Tabelle (IX) vereinigt. Die Bicarbonatvermehrung ist dabei so groß, daß entweder nahezu die ganze Atmung auf Lactatoxydation zu beziehen ist oder auch eine Synthese zu Kohlehydrat erfolgt.

Tabelle IX.

Lactatverbrauch der Niere, gemessen an der Zunahme des Bicarbonats.

Nr.	Datum 1925	Hungerzeit	Versuchszeit	$Q^B_{(M)}$ mit 0,2 Proz. Glucose	$Q^B_{(M)}$ mit n/100 milchsaurem Natrium	QO_2 mit milchsaurem Natrium
1	1. X.	2 Tage	1h30′	— 1,25	+ 4,0	22,0
2	5. X.	1 Tag	1 30	—	+ 5,2	—
3	5. XII.	1 „	1 20	—	+ 9,7	28,4

c) Milchsäureumsatz in der grauen Hirnsubstanz.

Daß auch die Atmung der grauen Hirnsubstanz in milchsäurehaltiger Ringerlösung aufrecht erhalten werden kann, ist bereits von *Loebel* gezeigt worden. Allerdings ist die Atmung hier nicht größer als in zuckerhaltiger Ringerlösung, sondern meist nur etwa ebenso groß. Auch dabei kann man den Umsatz der Milchsäure durch Bestimmung des scheinbaren respiratorischen Quotienten und Zunahme des Bicarbonats feststellen. Hier ist die zweite Methode vielleicht empfehlenswerter, weil wegen der großen Empfindlichkeit des Gewebes leicht die Atmungsgröße zweier verschiedener Schnitte gewisse Unterschiede zeigt, durch die die Bestimmung des scheinbaren respiratorischen Quotienten ungenau wird. Die anaerobe Glykolyse der nervösen Substanz fanden *Warburg* und seine Mitarbeiter größer als in anderen nicht wachsenden Geweben, und dementsprechend blieb auch in Sauerstoff eine verhältnismäßig große aerobe Glykolyse übrig. Setzt man aber zu zuckerhaltiger Ringerlösung Natriumlactat hinzu, so verschwindet die aerobe Glykolyse entweder ganz oder nahezu, indem der Wert des scheinbaren respiratorischen Quotienten ungefähr 1 wird. In vier Versuchen ergab sich γ zu 1,10, 0,90, 0,91, 1,02, während es ohne Zusatz des Lactats 1,2 und 1,3 betrug. Gleichzeitig aber wird auch die anaerobe Glykolyse durch Zusatz des milchsauren Natriums verringert, und zwar durch n/100 etwa auf die Hälfte. Suspendiert man Gehirnschnitte in milchsäurehaltiger Ringerlösung *ohne* Zucker, so werden die Werte für γ noch kleiner und sogar kleiner als der echte respiratorische Quotient, der unter diesen Umständen von *Loebel* zu

0,92 gefunden wurde. Die auf diesem Wege erhaltenen γ-Werte waren 0,39, 0,85, 0,865, 0,86, 0,66 (s. Tabelle X, 5 a bis 9).

Tabelle X.

Scheinbarer respiratorischer Quotient, Atmung und Glykolyse der grauen Hirnsubstanz in Traubenzucker-Ringer, Traubenzucker-Lactat und Lactat-Ringerlösung.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratte	Versuchszeit	Glucosezusatz Proz.	n Lactatzusatz	γ	Q_{O_2}	$Q_M^{(O_2)}$	$Q_M^{(N_2)}$
1	17. VII.	24h	40′	0,2	0,01	0,90	14,6	0	—
2	18. VII.	0	60	0,2	—	1,18	11,1	2,7	11,1
2a	18. VII.	0	60	0,2	0,01	1,10	12,55	1,3	5,35
3	16. XI.	0	60	0,2	—	1,22	16,7	3,7	—
3a	16. XI.	0	60	0,2	0,01	1,02	17,9	0,3	4,9
4	29. VII.	0	60	0,16	—	—	—	—	12,4
4a	29. VII.	0	60	0,16	0,008	—	—	—	8,1
5	24. VII.	0	80	0,16	0,008	0,90	7,5	—	4,2
5a	24. VII.	0	80	—	0,008	0,39	6,4	—	—
6	21. VII.	24	60	—	0,008	0,85	12,4	—	—
7	21. VII.	0	60	—	0,008	0,865	12,0	—	—
8	21. VII.	24	60	—	0,008	0,86	11,3	—	—
9	21. VII.	0	60	—	0,008	0,66	10,5	—	—

Die Bicarbonatvermehrung ergibt $Q^B_{(M)}$-Werte von 2,7 bis 4,4, was bei totaler und ausschließlicher Oxydation der Milchsäure einem Q_{O_2} von 8 bis 11 gleichkommt. Dies entspricht aber der gemessenen Atmungsgröße in Lactatlösung, so daß auch hier entweder die ganze Atmung auf Oxydation der Milchsäure zu beziehen ist oder eine wenn auch geringe bilanzmäßige Zunahme von Kohlehydrat stattfinden könnte.

Tabelle XI.

Lactatverbrauch der grauen Substanz, gemessen an der Zunahme des Bicarbonats.

Nr.	Datum 1925	Hungerzeit der Ratte	Versuchszeit	n Lactat-Konzentration	$Q^B_{(M)}$ mit Milchsäure	Q_{O_2} mit Milchsäure
1	21. VII.	24h	1h30′	0,016	3,9	7,2
2	21. VII.	24	1 30	0,02	2,7	11,3
3	21. VII.	0	1 30	0,02	4,4	10,5
4	1. X.	48	1 30	0,01	4,05	—
5	2. XII.	24	1 30	0,013	3,8	—

Auch mit der grauen Hirnsubstanz wurden einige Versuche in Serum gemacht, die das von *Warburg* gefundene Resultat, den Wegfall

der aeroben Glykolyse in Serum, bestätigen. Auch hier dürfte der gleichzeitigen Anwesenheit von Zucker und Milchsäure ein wesentlicher Anteil daran zukommen. Die Atmungsgröße des Gehirns wird in Serum nicht oder nur unwesentlich erhöht.

Tabelle XII.

Atmungsgröße und scheinbarer respiratorischer Quotient von grauer Gehirnsubstanz in Serum.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratte	Versuchszeit	γ	Q_{O_2}	$Q_M^{(O_2)}$
1	4. VII.	0	1h	1,015	10,4	0,15
2	4. VII.	0	2	0,975	15,4	0

Wie aus der Tabelle X hervorgeht, wird in der grauen Hirnsubstanz nicht nur die aerobe Glykolyse durch Milchsäure zum Verschwinden gebracht, sondern auch die anaerobe Glykolyse verringert. Es war deshalb die Frage zu stellen, ob in jedem Falle durch die Verringerung der anaeroben Glykolyse die aerobe zum Verschwinden gebracht wird. Diese Frage ist zu verneinen. Hemmt man z. B. die anaerobe Glykolyse durch geeignete Konzentrationen von Natriumfluorid, ohne die Atmung deutlich herabzusetzen, so bleibt doch der gleiche Glykolyserest in Sauerstoff bestehen. Benutzt man andererseits zur Aufrechterhaltung der Atmung Zucker, die schwächer glykolysieren, so wird die aerobe Glykolyse ähnlich wie durch Zusatz von Lactat zum Verschwinden gebracht. Geprüft wurden Mannose und Fructose. Die Oxydationsgröße mit ihnen ist annähernd so groß wie mit Traubenzucker; dagegen ist die anaerobe Glykolyse mit Mannose geringer, mit Fructose sogar nahezu Null (s. Tabelle XIII).

Tabelle XIII.

Atmung und Glykolyse mit Zusatz von NaF und verschiedenen Zuckern.

Nr.	Datum	Versuchszeit	Zusatz zur Ringerlösung	γ	Q_{O_2}	$Q_M^{(O_2)}$	$Q_M^{(N_2)}$
1	1. XI.	1h30′	0,2 Proz. Glucose	1,40	9,4	3,7	12,3
1a	1. XI.	1 30	0,2 Proz. Glucose, 0,02 Proz. NaF	1,33	9,5	3,1	1,8
2	5. XI.	1 30	0,2 Proz. Mannose	1,045	8,9	0,4	6,5
3	5. XI.	1 30	0,2 Proz. Fructose	1,065	8,4	0,5	0

Die aerobe Glykolyse bleibt in Gegenwart von Fluorid vielleicht deshalb übrig, weil sie durch Gewebsschädigung an den Schnittflächen verursacht wird, die wahrscheinlich durch das Fluornatrium noch gesteigert sein dürfte. Denn die mit Gewebsschädigung verbundene Glykolyse wird durch Sauerstoff wenig beeinflußt.

Anhangsweise seien die Versuche unter Zusatz von Insulin erwähnt, durch das in Ringerlösung keine Änderung des Stoffwechsels eintrat

(Insulin *Leo* in Konzentration von etwa $1 \cdot 10^{-5}$), während in Serum öfters, aber nicht immer, die Atmung ein wenig erhöht war. Es ist besonders hervorzuheben, daß die gewöhnliche α-β-Glucose der Ringerlösung in Abwesenheit von Insulin von der grauen Hirnsubstanz, deren eigener Insulingehalt für diese Wirkung nicht in Betracht kommen kann, sowohl glatt oxydiert wie in Milchsäure gespalten wird. Die vielfach vertretene Ansicht, daß die Glucose im Tierkörper nur in Gegenwart von Insulin angreifbar würde, ist daher zweifellos irrtümlich. Andererseits dürfte die Beobachtung, daß Fructose die bei Insulinhypoglykämie einsetzenden Krämpfe nicht verhindern kann, dadurch erklärbar werden, daß die Fructose zwar in der grauen Substanz ebenso leicht oxydiert wird, aber nicht zu Milchsäure gespalten werden kann. Zweifellos ist die Milchsäurebildung, auch wenn sie in Sauerstoff bilanzmäßig nicht in Erscheinung tritt, eine unentbehrliche vitale Funktion der nervösen Gewebe.

III. Über die glykolytische Wirksamkeit verschiedener Zucker.

a) Über die Glykolyse in der glatten Muskulatur.

Während im vorstehenden Kapitel vor allem der *Milchsäureschwund* im Säugetiergewebe unter dem Einfluß der Atmung untersucht wurde, war auch für die Milchsäurebildung festzustellen, ob die für sie geltenden Gesetzmäßigkeiten mit denen im Muskel gefundenen übereinstimmen. Bereits *Loebel* hat für die graue Substanz des Gehirns gezeigt, daß dies nicht der Fall ist, indem sowohl die Narkotisierbarkeit wie die Abhängigkeit von der Natur des gespaltenen Zuckers dem von *Warburg* festgestellten Typus der Carcinomglykolyse entspricht, dagegen nicht dem früher für den Muskel beschriebenen. Dies gilt auch für andere Gewebe, indem überall, soweit geprüft wurde, die Spaltungsgeschwindigkeit der Glucose die der anderen Zucker und des Glykogens übertrifft. Besonderes Interesse in dieser Richtung beansprucht die glatte Muskulatur, für die die Muscularis des Darms als Versuchsobjekt gewählt wurde. Da das Abschaben der Schleimhaut die Muscularis des Säugetierdarms schädigte, wurde die Muscularis aus der oberen Hälfte des Froschdarms benutzt, die verhältnismäßig leicht durch vorsichtiges Abschaben der Schleimhaut erhalten werden kann. Auch hier zeigte sich, daß die Milchsäurebildung aus Glucose bei weitem die aus anderen Zuckern, speziell aus Fructose und aus Glykogen übertrifft, im scharfen Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur. Allerdings haben auch Glykogen und Stärke ein deutliches Milchsäurebildungsvermögen. Es läßt sich dabei nicht ausschließen, daß diastatisches Ferment aus Rückständen der Schleimhaut die Spaltung

in Glucose veranlaßt. Bei Beurteilung der Versuchsresultate muß die Glykolyse ohne Zusatz berücksichtigt werden, die durch den Kohlehydratgehalt der Darmwand veranlaßt wird (Tab. XIV).

Tabelle XIV.

Glykolyse der glatten Muskulatur bei 20°.

Nr.	Datum	Versuchszeit	$Q_M^{(N_2)}$ ohne Zusatz	$Q_M^{(N_2)}$ mit Glucose	$Q_M^{(N_2)}$ mit Fructose	$Q_M^{(N_2)}$ mit Glykogen	$Q_M^{(N_2)}$ mit Stärke
1	25. XI.	4h	0,164	0,313	0,174	—	—
2	26. XI.	3 30'	0,101	0,507	0,115	0,115	—
3	27. XI.	4	0,12	0,65	—	0,31	0,38
4	28. XI.	4	0,063	0,425	0,124	0,196	0,21

Die Atmung wirkt auf die Milchsäurebildung in der glatten Muskulatur ähnlich wie in der Skelettmuskulatur, was nicht wundernimmt, da ja die gleiche Gesetzmäßigkeit für die verschiedenen Gewebe gilt. Der Oxydationsquotient $\frac{\text{Milchsäure verschwunden}}{\text{Milchsäureäquivalent oxydiert}}$ ergab sich in einem Versuch zu 4,2.

3 h, 20°, 0,1 Proz. Glucose, Muscularis des Darmes

$Q_{O_2}: 0{,}283$

$Q_M^{N_2}: 0{,}50$

$Q_M^{O_2}: 0{,}14$

0,36 cmm CO_2 verhindert durch 0,283 cmm O_2

$$\frac{0{,}36}{0{,}283} \cdot 3 = 4{,}2.$$

b) Milchsäurebildung aus Triosen.

Die Milchsäurebildung aus Dreikohlenstoffverbindungen hat Interesse wegen deren etwaiger Bedeutung als Zwischenprodukte bei der Spaltung der Hexosen. Die von *Neuberg* und *Dakin*[1]) entdeckte fermentative Umlagerung des Methylglyoxals in Milchsäure fügt sich, wie kürzlich gezeigt wurde[2]), in ihren Eigenschaften widerspruchslos der Vorstellung, daß die Spaltung der Hexosen über Methylglyoxal geschieht, jedenfalls insofern, als die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung in den verschiedenen Geweben aus Methylglyoxal größer ist als aus Traubenzucker. Von anderen Forschern werden dagegen Glycerinaldehyd und Dioxyaceton als solche Zwischenprodukte angesehen.

[1]) *Neuberg*, diese Zeitschr. 49, 502, 1913; *Dakin* und *Dudley*, Journ. of biol. Chem. 14, 155, 423, 1913.

[2]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. 159, 432, 1925.

Der Glycerinaldehyd wurde insbesondere von *Embden* und seinen Mitarbeitern[1]) dafür in Anspruch genommen, weil nach ihren Beobachtungen Erythrocyten von Hund und Mensch aus Glycerinaldehyd erheblich rascher Milchsäure bilden sollten als aus Traubenzucker; Dioxyaceton ebenfalls beträchtlich, wenn auch ein wenig schwächer. Die von uns vorgenommene Prüfung an verschiedenen Rattengeweben ergab indes ein negatives Resultat. Bereits *Loebel* berichtete über das Verhalten der grauen Substanz des Rattengehirns: während Glucose eine starke anaerobe Glykolyse ergab ($Q_{CO_2} = 10$ bis 16), waren Glycerinaldehyd und Dioxyaceton so gut wie wirkungslos, indem sie die Milchsäurebildung nicht deutlich über die in reiner Ringerlösung erhöhten. Dasselbe fanden wir, wie die untere Tabelle zeigt, auch noch mit anderen Geweben. Auch ein Versuch mit gewaschenen Erythrocyten vom Kaninchen mit Glycerinaldehyd ergab eine ganz geringfügige Säurebildung im Vergleich zur Glucose. Besonders beweisend ist das Verhalten der Retina, da diese nach *Warburg* das stärkst glykolysierende Organ überhaupt vorstellt (anaerobe Glykolyse nach *Warburg* im Durchschnitt $Q_M^{(N_2)} = 88$). Glycerinaldehyd ist hier vollständig wirkungslos. Etwas abweichend verhält sich das Nierengewebe insofern, als in mehreren Fällen aus Glycerinaldehyd annähernd soviel Milchsäure gebildet wurde wie aus Glucose. Doch ist bei der Niere die Steigerung der anaeroben Milchsäurebildung durch Zuckerzusatz unbeträchtlich und darum die Genauigkeit der Versuche gering[2]).

Tabelle XV.

Milchsäurebildung aus Glucose, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton.

Nr.	Datum 1925	Hungerzeit der Ratte	Gewebeart	Versuchszeit	$Q_M^{(N_2)}$ mit Glucose	$Q_M^{(N_2)}$ ohne Zusatz	$Q_M^{(N_2)}$ mit Glycerinaldehyd	$Q_M^{(N_2)}$ mit Dioxyaceton
1	8. X.	48h	Leber	1h	—	1,7	—	1,5
2	16. X.	0	"	1 30′	—	1,73	2,3	—
3	15. X.	0	Niere	1	5,3	0,7	4,2	1,5
4	16. X.	0	"	1 30	4,1	2,7	2,4	3,0
5	7. XI.	24	"	1 30	5,8	3,9	4,1	—
6	7. XI.	0	"	2	4,2	2,5	4,1	—
7	12. XI.	0	Retina	1	59,0	4,0	3,7	—
8	10. XI.	0	Erythrocyten (Kaninchen)	2	0,146	0,032	0,047	—

[1]) *Embden, Baldes* und *Schmitz*, diese Zeitschr. **45**, 108, 1912; s. dagegen *Sansum* und *Woodyatt*, Chem. Zentralbl. **1917**, I, 26, 27.

[2]) Herrn Prof. *Neuberg* sind wir für Überlassung frisch kristallisierten Glycerinaldehyds, Herrn Prof. *Schöller* (in Firma Schering-Werke auf Aktien) für kristallisiertes Dioxyaceton zu Dank verpflichtet.

Schließlich erwähnen wir noch anhangsweise Versuche über die Milchsäurebildung aus höheren Kohlehydraten. Während das milchsäurebildende Ferment des Muskels die aus der Stärke und dem Glykogen isolierten Grundkörper Trihexosan (*Pictet*) und Dihexosan (*Pringsheim*) mit einer ähnlichen Geschwindigkeit in Milchsäure spaltet, wie die Polysaccharide selbst, insbesondere das Trihexosan, ist es gegenüber Glucose und Maltose nahezu wirkungslos[1]). Umgekehrt zeigt sich aber, daß Trihexosan und Dihexosan von der grauen Hirnsubstanz ebensowenig glykolysiert werden können wie Glykogen, was erneut den prinzipiellen Unterschied zwischen der Milchsäurebildung in der Muskulatur und den übrigen Körpergeweben beleuchtet.

Wir danken Herrn *W. Schulz* für seine Mithilfe bei den Versuchen.

Zusammenfassung.

1. Es werden Methoden beschrieben zur manometrischen Messung des Milchsäure*verbrauchs* von Warmblütergeweben, die in Ringerlösung oder Serum atmen, sowie zur Bestimmung des Kohlehydrats in Gewebsschnitten von wenigen Milligrammen.

2. Mittels manometrischer Methoden ergibt sich bei der Atmung des Lebergewebes von Hungerratten in Ringerlösung bei Lactatzusatz außer einer Atmungssteigerung von etwa 50 bis 100 Proz. ein Schwund der Milchsäure, der, auf Oxydation bezogen, etwa der halben Atmungsgröße entsprechen würde. Bei gleichzeitiger Gegenwart von Zucker und Natriumlactat bleibt die „aerobe Glykolyse“ aus. Die bei der Atmung von Hungerlebern in Serum beobachtete stark erhöhte Atmung neben einem stark verkleinerten scheinbaren respiratorischen Quotienten erklärt sich zum Teil durch die Wirkung der in Serum enthaltenen Milchsäure. Doch ist obendrein auch der echte respiratorische Quotient unter diesen Umständen besonders klein.

3. Ähnlich verhalten sich verschiedene andere Säugetiergewebe. In der Niere steigt durch Lactat die Atmung gegenüber zuckerhaltiger Ringerlösung um 30 bis 40 Proz., und auch hier schwindet Milchsäure sogar in noch größerem Umfang. Dagegen wird die Atmung der grauen Substanz des Rattenhirns meist durch Milchsäure nicht stärker gesteigert als durch Zucker. Auch hier verschwindet aber die Milchsäure in einem Umfang, der, auf Oxydation bezogen, etwa der Atmungsgröße entspricht. Ebenso wie bei den anderen Geweben hebt Milchsäurezusatz zu zuckerhaltiger Ringerlösung die aerobe Glykolyse auf und setzt die anaerobe Glykolyse etwa auf die Hälfte herab.

---

[1]) *O. Meyerhof*, Naturwissensch. 14, 196, 1926.

4. Die Milchsäurespaltung der Zucker durch glatte Muskulatur unterscheidet sich von der im quergestreiften Muskel, stimmt aber mit der Glykolyse der übrigen Gewebe überein. Auch hier wird vorzugsweise Glucose gespalten, Glykogen und Stärke sehr viel schwächer und Fructose noch geringfügiger, während in der Skelettmuskulatur die Spaltung des Glykogens die der Fructose und Glucose übertrifft, die selbst annähernd gleich wirksam sind.

5. Glycerinaldehyd und Dioxyaceton bilden in allen geprüften Geweben weniger Milchsäure als Traubenzucker, ebenso sind Trihexosan und Dihexosan, die Grundkörper des Glykogens und der Amylose, die durch Muskelextrakt vorzüglich zu Milchsäure gespalten werden, gegenüber den glykolysierenden Geweben unwirksam.

Über Atmung und Kohlehydratumsatz tierischer Gewebe.

II. Mitteilung:

Atmung und Kohlehydratumsatz in Leber und Muskel des Warmblüters.

Von

R. Takane (Tokio).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 19. März 1926.)

Der biochemische Zusammenhang zwischen Zucker und Milchsäure ist seit langem bekannt. Das Entstehen von Milchsäure aus Kohlehydrat durch das in den verschiedenen tierischen Geweben, Muskel, Blut, Leber, vorhandene „glykolytische Ferment“ ist zuerst von *Claude Bernard*[1]) festgestellt worden, worauf in jüngster Zeit *O. Warburg*[2]) hinwies. Auch der umgekehrte Vorgang, die Umwandlung von Milchsäure in Kohlehydrat durch die lebende Zelle, ist schon im 19. Jahrhundert gefunden, zuerst von *Laurent*[3]), der 1890 die Anreicherung der Hefe an Glykogen in Lösungen von milchsaurem Salz beobachtete. Daß auch den höheren Tieren diese Fähigkeit zur Bildung von Zucker aus Milchsäure zukommt, ergab sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit aus zwei Versuchen von *Embden* und *Salomon*[4]) an pankreasdiabetischen Hunden, wo eine Zunahme der Zuckerausscheidung im Harn bei Milchsäurezufuhr beobachtet wurde. Gestützt wurde diese Deutung der Versuche durch ähnliche Ergebnisse von *Mandel* und *Lusk*[5]) am phlorrhizindiabetischen Hunde, wo die Zuckerausscheidung bei Milchsäurezufuhr zwar relativ nur unbedeutend anstieg, z. B. von 55 auf 64 g in 24 Stunden. Doch entsprach diese Zunahme in der Größenordnung der zugeführten Milchsäure. Weitere Versuche von *Dakin* und *Dudley*[6]) bestätigten das Resultat. Einen direkten Beweis für die

---

[1]) Vorlesungen über Diabetes, deutsch von *Posener*. Berlin 1878.

[2]) Diese Zeitschr. **160**, 307, 1925.

[3]) Ann. de Soc. Belg. de Microscopie 1890; zitiert nach *Cremer*, Asher-Spiros Ergebn. d. Physiol. **1**, 1. Hälfte, S. 905, 1902.

[4]) Hofmeisters Beitr. **6**, 63, 1904.

[5]) Amer. Journ. of Physiol. **16**, 139, 1906.

[6]) Journ. of biol. Chem. **15**, 143, 1913.

Umwandlung von Milchsäure in Kohlehydrat im Tierkörper erbrachten zuerst *Parnas* und *Baer*[1]) an der überlebenden Schildkrötenleber (allerdings nur in *einem* positiven Versuch), ebenso in einem einzelnen Versuch an der Säugetierleber *Barrenscheen*[2]), ein Befund, der mehrfach bestätigt wurde[3]).

Indes ist der Zusammenhang, der zwischen der Umwandlung der Milchsäure in Kohlehydrat und der Atmung besteht, erst in jüngster Zeit erkannt worden und ferner die Rolle aufgeklärt, die die Milchsäurebildung einerseits, die Rückverwandlung der Milchsäure in Kohlehydrat andererseits im Muskel für die Energielieferung der mechanischen Arbeit spielt[4]). Auch war bis dahin unbekannt gewesen, daß der isolierte Muskel überhaupt zur Synthese der Milchsäure zu Kohlehydrat befähigt ist.

Bereits in der voranstehenden Arbeit hatte sich die Wahrscheinlichkeit ergeben, daß auch in isolierten Säugetiergewebsschnitten sich unter dem Einfluß der Atmung eine Umwandlung von Milchsäure in Kohlehydrat vollzieht, die unter Umständen analytisch faßbar sein müßte. Doch war bisher ein direkter chemischer Nachweis einer solchen Umwandlung nicht geführt. Ebenso fehlte auf der anderen Seite ein Vergleich des Kohlehydratschwundes mit dem Sauerstoffverbrauch, aus dem sich schließen ließ, wieviel von der Ruheatmung auf Oxydation des Zuckers, wieviel auf andere Nährstoffe geht. Ich habe daher auf Vorschlag und unter Leitung von Herrn *Meyerhof* diese Lücken auszufüllen versucht und eine große Zahl von Kohlehydratbestimmungen gleichzeitig mit Messung der Atmung speziell in Lebergewebe und Muskulatur (Zwerchfell von Ratten) ausgeführt. Hierfür wurden die Gewebsschnitte teils in Ringerlösung mit und ohne Zusätze aufgeschwemmt, teils in Serum. Schließlich wurde der Einfluß des Insulins auf den Umsatz des Kohlehydrats unter den verschiedensten Umständen untersucht. Zu demselben Zwecke wurde nach den in der voranstehenden Arbeit von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* beschriebenen Methoden der Schwund zugesetzter Milchsäure im Zwerchfell studiert, sowie die Atmungsgröße und der respiratorische Quotient desselben in Serum mit und ohne Zusatz von Insulin.

Methodik.

Sowohl in den chemischen wie in den manometrischen Methoden folgte ich den in der voranstehenden Arbeit gemachten Angaben. Da die

[1]) Diese Zeitschr. 41, 386, 1912.
[2]) Ebendaselbst 58, 299, 1913.
[3]) Z. B. *Baldes* und *Silberstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 100, 34, 1917.
[4]) Zusammenfassung siehe *O. Meyerhof*, Asher-Spiros Ergebnisse der Physiol. 22, 328, 1923; ferner Springers Handb. d. Physiol. 8, 476, 1925.

Gewebsschnitte, die zur Atmung gedient hatten, nachher auf Kohlehydrat verarbeitet werden sollten, wurden sie nicht getrocknet, da sich in Vorversuchen ergeben hatte, daß dies die Kohlehydratbestimmung unmöglich macht. Sie wurden vielmehr ebenso wie die Kontrollgewebsschnitte vor dem Versuch auf einer Torsionswage von Hartmann & Braun feucht gewogen. Das Trockengewicht wurde auf Grund verschiedener Vergleiche mittels Division durch 5,5 für Zwerchfell und 5,0 für Leber festgestellt. Nach einer Reihe anfänglicher Fehlschläge stellte sich als äußerst wichtige Vorschrift heraus, daß die Gewebsschnitte nicht, wie sonst üblich, nach dem Schneiden in einer Schale mit Flüssigkeit ausgebreitet werden durften, ehe sie in die Atmungströge überführt wurden, sondern daß sie nach Anfertigung direkt auf die Wage und von hier in die Versuchsflüssigkeit gelangen mußten. Im anderen Falle findet vor allem aus dem Lebergewebe eine vorherige Auslaugung von Kohlehydrat statt, die zu schweren Fehlern in der Bestimmung des Anfangsgehalts führt. Allerdings setzt dies Verfahren eine ziemlich große Übung in der Anfertigung der Gewebsschnitte voraus. Durch ein mangelhaft angefertigtes Gewebsstück fällt die Atmung zu klein aus, wodurch die Versuchsgenauigkeit leidet. Solche Versuche wurden in der Regel verworfen. Der Sauerstoffverbrauch wurde, wo nichts anderes angegeben, unter Absorption von Kalilauge bestimmt. Die Ringerlösung enthielt stets ein Zehntel isotonisches Phosphat von p_H 7,4. Für die Serumversuche wurde inaktiviertes Pferdeserum, das angesäuert und ausgepumpt war, verwandt. Nur für die Bestimmung der Atmung und des scheinbaren respiratorischen Quotienten mit und ohne Insulinzusatz (s. unten Tabelle II) diente unverändertes Serum. Die Flüssigkeitsmenge betrug 1,0 bis 1,2 ccm.

In den Tabellen, in denen die chemisch bestimmte Kohlehydratänderung mit der Atmungsgröße des Gewebes verglichen wurde, ist in der letzten Spalte die Änderung des Kohlehydratgehalts in Prozenten des Sauerstoffverbrauchs ausgedrückt. Es ist zugrunde gelegt, daß 96 mg O_2 90 mg Kohlehydrat (auf Glucose berechnet) oxydieren. Dabei ist die etwa 20 Minuten lange Vorbereitungszeit, während der die in den Versuchsflüssigkeiten suspendierten Gewebsschnitte zwar atmen, die Messung aber noch nicht begonnen hat (Sauerstoffsättigung, Temperaturausgleich), vernachlässigt. Da sie nur etwa 10 Proz. der Meßzeit beträgt, kommt sie bei der nicht unbeträchtlichen Fehlerbreite der Bestimmungen nicht wesentlich in Betracht. Auf dieselbe Weise ist auch die Kohlehydrat*zunahme* in Prozenten des Sauerstoffverbrauchs berechnet, was nur zum Vergleich der Größenordnung der Synthese des Kohlehydrats gegenüber dem sonstigen Kohlehydratschwund dienen soll. Ob der Schwund des Kohlehydrats auf Oxydation oder Milchsäurespaltung zu beziehen ist, kann erst in Verbindung mit der Bestimmung des Bicarbonatgehalts entschieden werden (s. darüber unten, S. 409).

Versuche am Zwerchfell.

Vom Zwerchfell durften für die Kohlehydratbestimmungen nur die vorderen zwei Drittel benutzt werden, da das hintere Drittel, abgesehen von seiner größeren Dicke, einen nicht genau übereinstimmenden Kohle-

hydratgehalt besaß. Einige Kontrollbestimmungen sind in der Tabelle I enthalten.

Tabelle I.

Kohlehydratgehalt in verschiedenen Zwerchfellabschnitten.

	Feuchtgewicht mg	Verbrauch in n/200 Thiosulfat	Zucker mg	Kohlehydrat Proz.
1. Vorderer Teil . . .	15,7	0,75	0,127	0,81
2. „ „ . . .	19,9	0,95	0,161	0,81
3. „ „ . . .	21,0	1,00	0,169	0,80
4. Hinterer Abschnitt	20,7	0,75	0,127	0,615

Der Kohlehydratgehalt des Rattenzwerchfells ist meist etwas geringer als der der Skelettmuskulatur. Während er bei ernährten Ratten 0,6 bis 1 Proz. beträgt, sinkt er bei zweitägigem Hungern auf etwa die Hälfte. Zu den meisten Versuchen dienten Ratten, die 48 Stunden gehungert hatten. Vergleicht man den Sauerstoffverbrauch von in zuckerfreier Ringerlösung aufgeschwemmten Zwerchfellstücken mit der Kohlehydratabnahme, so fällt sofort auf, daß nur ein verhältnismäßig kleiner Teil der Oxydation auf Kohlehydrat bezogen werden kann, besonders wenn der Sauerstoffverbrauch von normaler Größe ist. Hierauf ist schon früher von *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier* hingewiesen[1]). Relativ größer ist der Kohlehydratschwund bei kleiner oder stark absinkender Atmung, doch liegt hier der Verdacht nahe, daß unter diesen Umständen auch Milchsäure entstehen kann. In den übrigen Fällen können nur 20 bis 50 Proz. des Sauerstoffverbrauchs auf Kohlehydratschwund bezogen werden. Eine Reihe derartiger Versuche sind in Tabelle IIA und B zusammengestellt, wobei anfänglich Glykogen und niedere Kohlehydrate getrennt bestimmt wurden, später vereinigt. Zu diesem Kohlehydratschwund kommt aber, wie ebenfalls schon früher erwähnt, ein Schwund der Milchsäure hinzu, indem die bei der Herstellung der Zwerchfellschnitte spontan gebildete Milchsäure im Laufe der Zeit in Gegenwart von Sauerstoff abnimmt. Zwei derartige Versuche sind in Tabelle III angegeben, wobei in dem zweiten Versuch noch Natriumlactat hinzugegeben wurde. Indes macht der Schwund der spontan gebildeten Milchsäure auch nur etwa 15 Proz. des Sauerstoffverbrauchs aus. [In dem früheren Versuch entsprach der Milchsäureschwund 18 Proz. des Sauerstoffverbrauchs[2])]. Es kämen danach ein bis zwei Drittel der Atmung auf Kohlehydratoxydation; weiterhin darf, nach der Ammoniakabspaltung zu urteilen, etwa 10 Proz.

---

[1]) Diese Zeitschr. 157, 482, 1925.

[2]) *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*, diese Zeitschr. 157, 45[illegible], 1925.

Tabelle II.

Atmung und Kohlehydratschwund des Rattenzwerchfells in Ringerlösung.

A. Atmungsversuche.

Nr.	Datum 1925	Versuchszeit	Schnittgewicht feucht	Zusätze zur Ringerlösung	cmm O_2 verbraucht	mg O_2 verbraucht	Q_{O_2} im Mittel der Versuchszeit	Bemerkungen
1	12. I.	5h	34,0	—	207	0,296	6,85	Ernährte Ratte
2	18. II.	5	55,0	—	256	0,366	5,1	Hungerratte
3	21. II.	5	47,0	—	307	0,44	7,14	Ernährte Ratte
4a	23. II.	5	34,5	—	92,5	0,132	2,9*)	" "
4b	23. II.	5	43,2	n/50 Natriumlactat	168	0,24	4,3*)	" "
5	6. III.	5	64,5	—	259	0,37	4,45	Hungerratte
6a	25. II.	5	34,2					Keine Atmungsmessung
6b	25. II.	5	57,0	n/100 Natriumlactat				
7	30. IV.	3	38,0	—	124	0,178	5,95	48 h-Hungerratte
8	21. XII.	6	32,5	—	254	0,364	6,52	48 h- "
8a	21. XII.	6	33,2	n/60 Natriumlactat	286	0,409	7,17	

*) Atmung nach 2 Stunden stark abfallend.

B. Kohlehydratbestimmungen.

Nr.	Vorher				Nachher				Berechnung		
	Schnittgewicht	Kohlehydratanteil*)	Kohlehydrat mg	Kohlehydrat (auf Feuchtgewicht bezogen) Proz.	Schnittgewicht	Kohlehydratanteil*)	Kohlehydrat mg	Kohlehydrat (auf Feuchtgewicht bezogen) Proz.	Kohlehydratschwund mg	Schwund in Proz. des Frischgewichts	Kohlehydratschwund in Proz. des Sauerstoffverbrauchs
1	39,4	G	0,116	0,42	34,0	G	0,086	0,80	0,041	0,12	15
		K	0,245			K	0,190				
2	60,0	G	0,049	0,318	55,0	G	0,015	0,156	0,081	0,147	24
		K	0,142			K	0,071				
	41,0	G	0,032	0,288							
		K	0,086								
3	38,4	S	0,24	0,625	47,0	S	0,142	0,305	0,143	0,32	35
4a	45	S	0,265	0,59	34,5	S	0,130	0,38	0,072	0,21	57
4b					43,2	S	0,188	0,435	0,067	0,155	30
5	37,7	S	0,285	0,75	64,5	S	0,265	0,41	0,22	0,34	63
6a	57,0	S	0,34	0,598	34,2	S	0,143	0,416	0,062	0,182	
6b					57,0	S	0,235	0,41	0,108	0,189	
7a	53,2	S	0,225	0,42	38,0	S	0,0665	0,175	0,090	0,22	54
7b	35,2	S	0,138	0,395							
8a	36,6	S	0,18	0,49	32,5	S	0,13	0,40	0,029	0,09	10
8b					33,2	S	0,13	0,39	0,033	0,10	10

*) G = Glykogen, K = niedere Kohlehydrate, S = Summe von beiden.

Tabelle III.

Chemische Bestimmung des Milchsäureschwundes im Zwerchfell in Ringerlösung.

A. Atmungsmessung.

Nr.	Datum	Versuchszeit	Schnittgewicht feucht mg	Zusätze	O_2 cmm	O_2 mg	QO_2	Bemerkungen
1	2. III.	5h	655	—	3050	4,52	5,12	je 1/2 von 4 Zwerchfellen
2	10. III.	5 40′	210	n/100 Natriumlactat	1233	1,76	5,7	je 1/2 von 2 Zwerchfellen

B. Chemische Bestimmung.

Nr.	Vorher			Nachher			Milchsäureschwund	Milchsäureschwund in Proz. des O_2-Verbrauchs
	Schnittgewicht mg	Milchsäure mg	Milchsäure Proz.	Schnittgewicht mg	Milchsäure mg	Milchsäure Proz.	mg	
1	659	0,75	0,11	655	0,22	0,033	0,5225	12,5
2	210	4,15	(1,98)	210	3,22	(1,53)	0,93	56

auf Eiweißspaltung bezogen werden. Der Rest muß als Oxydation von Fett gedeutet werden.

Bei Zusatz von n/50 Natriumlactat zur Ringerlösung wird der Kohlehydratschwund trotz Erhöhung der Atmung nur wenig verringert, manchmal auch gar nicht. Eine bilanzmäßige Synthese wie im isolierten Kaltblütermuskel ist nicht festzustellen. Doch darf dies nicht im Sinne eines prinzipiellen Unterschieds von Warm- und Kaltblütermuskel gedeutet werden, sondern rührt offenbar daher, daß infolge der Durchschneidung des Zwerchfells die Kohlehydratspaltung gegenüber dem intakten Muskel gesteigert wird und dieser an den Schnitträndern sich abspielende Zerfall durch die Resynthese in den unbeschädigten Teilen nicht kompensiert werden kann. Dies folgt vor allem aus den Versuchen in Serum, wo im Grenzfall eine solche Synthese beobachtet werden kann (s. unten, Tabelle VII). Gleichzeitig wird eine erhöhte Menge Milchsäure umgesetzt. In Versuch 2, Tabelle III, werden 50 Proz. des Sauerstoffverbrauchs durch die Oxydation des verschwindenden Lactats gedeckt. In einem unten wiedergegebenen Versuch (Tabelle IV, Nr. 1) entspricht die Zunahme des Bicarbonats einem Lactatschwund von etwa 25 Proz. des Sauerstoffverbrauchs. Wird Traubenzucker zur Ringerlösung hinzugesetzt, so ist der Kohlehydratschwund sofort erheblich größer, öfters sogar größer als es dem Sauerstoffverbrauch entspricht. Hier findet offenbar neben der Atmung auch eine Glykolyse statt. Ich habe infolgedessen auf die Durchführung

solcher Versuche verzichtet, da es schwierig ist, in dem gleichen Versuch festzustellen, wieviel von dem Zucker durch Oxydation, wieviel durch Spaltung verschwindet. Anders aber in Serum, wo eine solche Milchsäurebildung in Sauerstoff nicht mehr stattfindet. Das hier verschwindende Kohlehydrat kann demnach als oxydiert angenommen werden.

Um die Vorgänge in Serum zu studieren und unabhängig von den Änderungen des Kohlehydratgehalts dem Umsatz der Milchsäure zu folgen, wurde nach den in der voranstehenden Arbeit von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* angegebenen Methoden die Änderung des Bicarbonatgehalts, die Atmung und der scheinbare respiratorische Quotient in normalem, inaktiviertem Pferdeserum bestimmt. Dabei wurde teils das Serum unverändert benutzt, teils wurde noch Glucose oder Natriumlactat hinzugefügt. Das benutzte Pferdeserum enthält in der Regel nur 0,05 Proz. Traubenzucker und etwa ebensoviel Milchsäure infolge der vorangegangenen Glykolyse der Erythrocyten. Hierbei wurde eine Reihe von Parallelbestimmungen mit und ohne Insulin gemacht, um einen Einfluß desselben auf die Atmung zu untersuchen. Über die Änderung des Bicarbonatgehalts belehrt die Tabelle IV, wobei die Bezeichnungen dieselben sind wie in der vorstehenden Arbeit.

Tabelle IV.

Milchsäureschwund im Zwerchfell, gemessen an der Änderung des Bicabonats.

Nr.	Datum	Hungerzeit der Ratte Stdn.	Versuchszeit Stdn.	Suspensionslösung	$Q^B_{(M)}$	Q_{O_2}
1	4. I.	24	6	Ringer + n/50 Natriumlactat	+ 0,59	8,3
2	15. X.	48	$3^1/_2$	Serum + 0,05 Proz. Glucose	+ 0,5	6,1
2a	15. X.	48	$3^1/_2$	Serum + 0,05 Proz. Glucose + 2 × 10^{-5} Insulin	+ 1,0	6,3
3	28. X.	24	3	Serum + 0,006 n Natriumlactat	+ 2,25	—
3a	28. X.	24	3	Serum + 0,006 n Natriumlactat + 2 × 10^{-5} Insulin	+ 2,0	—

In einem Versuch (Tabelle IV, 1) wurde die Bicarbonatvermehrung in Ringerlösung unter Zusatz von milchsaurem Natrium bestimmt und ergab $Q^B_{(M)}$ + 0,59, was einer Oxydationsgröße von 1,8 cmm O_2 entspricht. Etwa ebenso groß ist der $Q^B_{(M)}$-Wert in Serum mit Glucosezusatz (Versuch 2), so daß hier ebenfalls ein Milchsäureschwund stattfindet, aber kein beträchtlicher. Dieser steigt jedoch durch Lactatzusatz auf $Q^B_{(M)} = + 2,0$, was einem Q_{O_2}-Wert von 6 entspricht, also annähernd der Atmungsgröße des Zwerchfells in Serum. Ähnliche Resultate ergeben sich bei der Messung des scheinbaren respiratorischen Quotienten,

zumal wenn wir die Werte mit der direkten Bestimmung des wahren respiratorischen Quotienten vergleichen, die allerdings in ausgepumptem Serum vorgenommen werden muß. Dieser direkt bestimmte respiratorische Quotient ergab sich in vier Versuchen zu 0,66 bis 0,90 ohne Insulin und 0,79 bis 0,955 mit Insulin. Offenbar ist er also mit Insulin etwas höher, doch ist die Methode nicht besonders genau.

Tabelle V.

Bestimmung des echten respiratorischen Quotienten des Zwerchfells in ausgepumptem Serum.

Nr.	Datum	Hungerzeit Stdn.	Versuchszeit	Zusätze zum Serum	Insulin g pro ccm	Respirator. Quotient ohne Insulin	Respirator. Quotient mit Insulin	Q_{O_2} ohne Insulin	Q_{O_2} mit Insulin
1	15. X.	48	3h30′	0,05 Proz. Traubenzucker	2×10^{-5}	0,83	0,955	6,1	6,3
2	18. IX.	24	1 30	0,06 Proz. Traubenzucker	5×10^{-6}	0,90	0,93	8,3	6,5
3	24. X.	48	2 30	0,1 Proz. Traubenzucker	2×10^{-5}	0,66	0,79	4,15	6,05
4	28. X.	24	3	0,06 n Natriumlactat	—	0,75	—	4,4	—
				Durchschnitt		0,79	0,89	5,7	6,3

Da der scheinbare respiratorische Quotient außer durch die Atmungskohlensäure auch noch durch die Kohlensäureretention infolge des Bicarbonatschwunds bestimmt wird, muß er ein wenig kleiner als der echte respiratorische Quotient sein, zumal bei Zusatz von milchsaurem Natrium. Dieses trifft auch zu (s. Tabelle VI). Auch der scheinbare respiratorische Quotient ist bei Zusatz von Insulin in der Regel

Tabelle VI.

Atmungsgröße und „scheinbarer respiratorischer Quotient“ des Zwerchfells in inaktiviertem Pferdeserum.

Nr.	Datum	Hungerzeit	Versuchszeit	Zusätze zum Serum	Insulin in 1 ccm Lösung g	γ ohne Insulin	γ mit Insulin	Q_{O_2} ohne Insulin	Q_{O_2} mit Insulin
1	5. VII.	24h	1h20′	—	2×10^{-5}	0,624	0,805	5,6	7,97
2	7. VII.	24	1	—	2×10^{-5}	0,60	0,94	4,1	6,85
3	8. VII.	24	1	—	2×10^{-5}	0,94	0,845	8,18	7,7
4	25. VII.	24	1	—	—	0,74	—	5,5	—
5	25. VII.	24	1	n/100 Natriumlactat	5×10^{-6}	0,635	0,843	4,2	5,1
6	26. VII.	48	1 20	0,08 Proz. Traubenzucker	5×10^{-6}	0,784	0,89	5,65	7,5
7	28. VII.	24	1 20	0,08 Proz. Traubenzucker	1×10^{-5}	0,78	0,96	6,88	7,84
				Durchschnitt:		0,73	0,88	5,9	7,2

größer. Dasselbe gilt für die Atmungsgröße des Zwerchfells, die durch Insulin meist um etwa 20 Proz. erhöht wird, wie es auch in den späteren Versuchen der Tabelle VII gefunden wurde. Hierbei wurden ausschließlich hungernde Ratten benutzt[1]).

Der verhältnismäßig geringe Einfluß des Insulins auf die Atmung der Muskulatur dürfte nach allem, was über die Insulinwirkung bekannt geworden ist, sekundärer Natur sein. Offenbar greift das Insulin primär bei der Umwandlung von Glucose in Glykogen an, indem es diesen Vorgang beschleunigt, und versieht damit den Muskel in genügender Menge mit demjenigen Kohlehydrat, das er allein mit größerer Geschwindigkeit umzusetzen vermag, während er Glucose direkt nicht oder nur langsam angreift. Auf diese Weise erklärt sich wohl der stärkere Einfluß des Insulins bei Glykogenarmut des Körpers und andererseits der geringere beim Kaltblütermuskel, der für seinen verhältnismäßig langsamen Kohlehydratverbrauch über einen genügenden Glykogenvorrat verfügt[2]).

Man muß nach diesen Versuchen erwarten, daß der Kohlehydratschwund in Serum niemals größer, aber meist kleiner sein wird, als sich

---

[1]) *Burn* und *Dale* (Journ. of Physiol. **59**, 185, 1924/25) fanden am Muskelpräparat der Katze bei Durchströmung mit insulinhaltigem Blute ebenfalls im Durchschnitt eine Steigerung der Oxydation um etwa 20 bis 30 Proz., die natürlich nicht ausreicht, das gesteigerte Verschwinden des Blutzuckers zu erklären. Daß andere Autoren die Oxydationssteigerung im überlebenden Warmblütermuskel vermißten, liegt entweder an den betreffenden Insulindosen oder aber an den Bedingungen der Atmung des Muskels, vor allem der Suspendierung in Ringerlösung, wo man allerdings keinen Einfluß auf die Atmungsgröße findet. Daß die Wirkung des Insulins nur in Serum deutlich ist, hängt vielleicht zusammen mit der Beobachtung von *Häusler* und *Loewi* (Pflügers Arch. **210**, 238, 1925), wonach Insulin nur in Gegenwart von Serum oder Plasma die Aufnahme von Glucose von seiten der Zellen erhöht.

Andererseits gibt *Ahlgren* an (Skandinav. Arch. f. Physiol., Supplementband, 1925), daß Insulin Leo in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-14} die Entfärbung von Methylenblau unter anaeroben Bedingungen durch in Phosphatlösung suspendierte Froschmuskulatur um 60 bis 80 Proz. beschleunige, während bei Konzentrationen von 10^{-5} eine Hemmung von 30 bis 40 Proz. stattfinden soll. Er schließt daraus auf eine Steigerung, bei höheren Konzentrationen auf eine Hemmung der Muskelatmung um diesen Betrag. Demgegenüber wurde in den hier ausgeführten Versuchen die Atmungsgröße zerschnittener Froschmuskulatur, die in Phosphatlösung suspendiert war, bei 20° durch Insulinkonzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-14} nicht in einer die Fehlergrenze der Methode überschreitenden Weise beeinflußt.

[2]) Vgl. auch die Arbeiten von *Lundsgaard* und *Holbøll*, Journ. of biol. Chem. **62**, 1924; **65**, 1925; die Diskussion von *E. J. Lesser*, Handb. d. Biochem. **9**, 2. Aufl., S. 160, 1925; die Zusammenstellung von *Grevenstuck* und *Laqueur*, Ergebn. d. Physiol. **23**, II, S. 1, 1925.

aus der Atmungsgröße errechnet. Denn es findet ja daneben ein, wenn auch nicht sehr bedeutender, Milchsäureschwund statt. Auch beide zusammen werden jedenfalls nicht den gesamten Sauerstoffverbrauch decken können, wie sich schon aus dem Ansteigen des respiratorischen Quotienten in Gegenwart von Insulin ergibt. Tatsächlich sind die chemischen Bestimmungen der Kohlehydratänderung im Serum mit den aus den manometrischen Versuchen gezogenen Schlußfolgerungen in gutem Einklang (s. Tabelle VII). In unverändertem Serum ist der Kohlehydratschwund zwar höher als in Ringerlösung ohne Zusatz, bleibt aber doch beträchtlich hinter dem Sauerstoffverbrauch zurück. Dasselbe gilt für den Fall (s. Versuch 3 und 4), daß Serum benutzt wird, das 1 bis 2 Tage in Kollodiumhülsen gegen Ringerlösung zur Entfernung der Hauptmenge des Zuckers dialysiert war[1]). Übrigens änderte hier der Zuckerzusatz nichts am Kohlehydratschwund, der in allen Versuchen 30 bis 70 Proz. des aus der Atmungsgröße berechneten betrug. Dagegen erhöhte Insulinzusatz in Gegenwart von Traubenzucker in allen Fällen den Kohlehydratschwund. Trotz der nicht

Tabelle VII.

Kohlehydratumsatz im Zwerchfell hungernder Ratten in Serum (48 Stunden Hungerzeit).

A. Atmung.

Nr.	Datum	Versuchszeit	Schnittgewicht feucht mg	Zusatz zum Serum	O_2 cmm	O_2 mg	Q_{O_2}
1	26. VI.	4h	29,0	—	142	0,206	6,85
1a	26. VI.	4	37,0	Insulin 2×10^{-5}	218	0,311	8,2
2	30. VI.	3	36,5	—	130	0,186	6,6
2a	30. VI.	3	33,4	Insulin 2×10^{-5}	148	0,212	8,2
3	2. VII.	3	26,8	2 Tage dialysiert. Serum	127	0,182	8,6
3a	2. VII.	3	23,4	+ 0,05 Proz. Glucose	79	0,113	6,2
3b	2. VII.	3	22,1	+ 0,05 " " + Insulin 1×10^{-5}	94	0,134	7,8
3c	2. VII.	3	21,4	+ 0,01 n Natriumlactat	104	0,150	8,9
4	4. VII.	3	31,0	2 Tage dialysiert. Serum	142	0,204	8,4
4a	4. VII.	3	31,2	+ 0,01 n Natriumlactat	150	0,214	8,7
4b	4. VII.	3	50,0	+ 0,01 n " + 10^{-5} Insulin	210	0,300	7,8
4c	4. VII.	3	32,2	+ 0,05 Proz. Glucose	109	0,156	6,3
5	17. X.	3	33,3	—	140	0,200	7,7
5a	17. X.	3	26,4	0,05 Proz. Glucose	83	0,118	5,72
5b	17. X.	3	27,4	0,05 " " + 2×10^{-6} Insulin	85	0,120	5,70

[1]) Die noch übrig gebliebene Reduktion nach *Hagedorn-Jensen* ist vielleicht kein Zucker. Vgl. hierzu *Hiller, Almer, Linder* und *van Slyke*, Journ. of biol. Chem. 64, 625, 1925.

B. Kohlehydratbestimmungen.

Nr.	Vorher: Schnittgewicht feucht	Vorher: Kohlehydrat mg	Vorher: Kohlehydrat Proz.	Zucker in Versuchsmenge Serum mg	Nachher: Schnittgewicht	Nachher: Kohlehydrat mg	Berechnet Kohlehydrat für Anfangsgehalt mg	Kohlehydratschwund mg	Kohlehydratschwund in Proz. des Feuchtgewichts	Kohlehydratschwund in Proz. des Sauerstoffverbrauchs
1	29,4	0,178	0,615	0,162	29,0	0,275	0,335	0,060	0,205	32
1a	19,0	0,11	0,585	0,162	37,0	0,202	0,382	0,180	0,49	62
2	53,2	0,275	0,42	0,40	36,5	0,429	0,549	0,120	0,332	68
2a	35,2	0,138	0,395	0,40	33,4	0,324	0,536	0,208	0,61	113
3	23,2	0,166	0,73	0,08	26,8	0,167	0,270	0,103	0,394	60
3a	41,2	0,280	0,68	dialysiert 0,53 *)	23,4	0,681	0,745	0,064	0,278	60
3b	—	—	—	dialysiert 0,53 *)	22,1	0,619	0,736	0,117	0,525	94
3c	—	—	—	dialysiert 0,08	21,4	0,308	0,23	+ *0,078*	+ *0,365*	[+ *55*] **)
4	25,0	0,345	1,38	dialysiert 0,08	31,0	0,370	0,505	0,135	0,43	71
4a	50,5	0,725	1,43	dialysiert 0,08	31,2	0,505	0,510	0,005	0,02	2
4b	—	—	—	dialysiert 0,08	50,0	0,82	0,77	+ *0,05*	+ *0,10*	[+ *18*] **)
4c	—	—	—	dialysiert 0,55 *)	32,0	0,88	0,99	0,11	0,33	76
5	27,8	0,281	1,00	dialysiert 0,475	23,3	0,537	0,714	0,177	0,53	95
5a	19,4	0,193	1,01	0,92 *)	26,4	1,007	1,148	0,141	0,54	120
5b	—	—	—	0,92 *)	27,4	0,995	1,158	0,63	0,60	140

*) Mit Zuckerzusatz. **) Zunahme des Kohlehydrats.

unbeträchtlichen Fehlerbreite der Versuchsanordnung darf man daraus entnehmen, daß unter diesen Umständen im Zwerchfell mehr Kohlehydrat oxydiert wird, ähnlich wie es aus der Vergrößerung des respiratorischen Quotienten gefolgert werden kann. Auch hier ergab sich stets eine etwas gesteigerte Atmung mit Insulin. Wird dagegen Natriumlactat zu dialysiertem, fast zuckerfreiem Serum hinzugefügt, so hört der Kohlehydratschwund vollständig auf (Versuch 3c, 4a und b), ja, es findet sogar in einigen Fällen eine Zunahme statt. Das ist im Einklang mit der durch Lactatzusatz erhöhten Einsparung des Bicarbonats, die schon in nicht dialysiertem Serum etwa einem Lactatschwund von dem Umfang der Atmungsgröße entspricht.

Daß der intakte isolierte Warmblütermuskel bei Durchspülung mit zuckerhaltiger Salzlösung auch während der Arbeitsleistung neben Kohlehydraten Fett und Eiweiß oxydieren kann, scheint aus einer älteren Arbeit von *E. Rohde* am Kaninchen- und Katzenherzen hervorzugehen[1]). Das Herz deckt hier nur einen Teil seiner Atmung aus dem Zucker der Nährlösung, den Rest aber aus Reservestoffen, die mit

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 181, 1910.

dem respiratorischen Quotienten von 0,72 bis 0,78 verbrennen. Der respiratorische Quotient dieses Reststoffwechsels ist bei Herzen hungernder Tiere besonders niedrig, bei kohlehydraternährten erheblich höher. Unter möglichst physiologischen Bedingungen — Durchströmung mit insulinhaltigem Blut oder Serum — wird aber offenbar der Anteil der Kohlehydratoxydation des Warmblütersmuskels mehr und mehr gesteigert. Andererseits ist der isolierte Kaltblütermuskel, der stets Glykogen in erheblichen Mengen enthält und dieses nur langsam verbraucht, nicht unter Bedingungen zu versetzen, wo bei der Arbeitsleistung neben Kohlehydrat noch Fett oder Eiweiß in nachweislichen Mengen verschwinden. Diese Resultate stehen in keinem Widerspruch zu der von *O. Meyerhof* gegebenen Erklärung für die Energetik des oxydativen Restitutionsvorgangs, worauf schon kürzlich hingewiesen wurde[1]).

Versuche mit Lebergewebe.

a) Versuche in Ringerlösung.

Eine größere Zahl von Kohlehydratbestimmungen wurde mit Lebergewebe ausgeführt, da sich hier in der voranstehenden Arbeit von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* die Wahrscheinlichkeit ergeben hatte, daß deutliche Änderungen des Kohlehydratgehalts unter den verschiedenen Umständen in Erscheinung treten mußten. Meine eigenen Messungen bestätigen dies. Auch hier wurden zunächst Bestimmungen in Ringerlösung mit und ohne Zusatz von milchsaurem Natrium ausgeführt. In der größten Zahl der Versuche, im ganzen elfmal, wurde durch Milchsäurezusatz eine bilanzmäßige Zunahme des Kohlehydrats erzielt, die in der Größenordnung des Sauerstoffverbrauchs lag, derart, daß der Kohlehydratgehalt statt in einem Betrage von 40 bis 100 Proz. des Sauerstoffverbrauchs abzunehmen, wie es ohne Zusatz geschieht, in einem ähnlichen Betrag zunahm. Zur Berechnung des Oxydationsquotienten

$$\frac{\text{Mol. Milchsäure verschwunden}}{\text{Mol. Milchsäureäquivalente oxydiert}}$$

sind die Versuche allerdings nicht geeignet; abgesehen von der zu geringen Fehlergenauigkeit und den großen Schwankungen wird ja auch nur ein Teil der Atmung durch Kohlehydratoxydation gedeckt. Auch sollte hier in Analogie zum Muskel nur die Atmungssteigerung und nicht die Ruheatmung selbst für die Berechnung berücksichtigt werden, was aber bei den offenbar aus sekundären Ursachen schwankenden Werten nicht durchführbar ist. In einigen anderen Fällen wurde keine bilanzmäßige Zunahme des Kohlehydrats gefunden, aber auch dann war der Kohlehydratschwund durch Milchsäurezusatz

[1]) Diese Zeitschr. 158, 218, 1925.

verringert trotz gleichzeitig gesteigerter Atmung. In mehreren Fällen wurden Doppelversuche ausgeführt, außerdem auch die Anfangswerte doppelt bestimmt. Diese sind sämtlich, soweit nicht einzelne Bestimmungen verloren gingen, in die Tabelle aufgenommen. Die Resultate stimmen im allgemeinen innerhalb 15 Proz. überein. In mehreren Versuchen wurde Alanin und Asparagin zur Ringerlösung hinzugefügt, da beide Substanzen als Zuckerbildner im Tierkörper bekannt sind und in den früheren Versuchen von *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier* die Atmung des Lebergewebes in ähnlichem Betrage wie milchsaures Natrium gesteigert hatten. Gerade in den zwei besten

Tabelle VIII.

Atmung und Kohlehydratumsatz von Lebergewebe in Ringerlösung.

A. Atmung.

Nr.	Datum	Versuchszeit	Feuchtgewicht der Schnitte	Zusatz zur Ringerlösung	O_2 cmm	O_2 mg	Q_{O_2}	Bemerkungen
1	15. V.	3h	25,7	—	148	0,213	10,6	1 Tag Hunger
1a	15. V.	3	16,0	0,02 n Natriumlactat	99	0,133	11,2	
1b	15. V.	3	27,1	0,02 n Natriumlactat + 8 × 10^{-6} Insulin	128	0,183	8,7	
2	23. V.	3	26,2	—	162	0,230	11,4	1 Tag Hunger
2a	23. V.	3	24,2	0,01 n Natriumlactat	305	0,437	23,0	
2b	23. V.	3	26,5	0,02 n Natriumlactat + 8 × 10^{-6} Insulin	215	0,305	14,9	
3	26. V.	3	18,0	—	94	0,135	9,5	1 Tag Hunger
3a	26. V.	3	14,2	0,02 n Natriumlactat	101	0,144	12,9	
3b	26. V.	3	19,1	0,01 n Natriumlactat + 8 × 10^{-6} Insulin	154	0,220	14,8	
4	5. VI.	3	37,6	—	215	0,310	10,6	2 Tage Hunger
4a	5. VI.	3	31,7	(Doppelbestimmung)	168	0,240	9,7	
4b	5. VI.	3	27,0	0,02 n Natriumlactat	279	0,395	19,0	
4c	5. VI.	3	26,1	0,02 n Natriumlactat + 8 × 10^{-6} Insulin	222	0,317	16,6	
5	9. VI.	3	23,0	—	138	0,197	11,2	1 Tag Hunger
5a	9. VI.	3	20,8	(Doppelbestimmung)	107	0,154	9,5	
5b	9. VI.	3	18,7	0,02 n Natriumlactat	207	0,296	20,7	
5c	9. VI.	3	19,1	0,02 n Natriumlactat + 8 × 10^{-6} Insulin	215	0,305	20,5	
6	18. XII.	2 20′	28,0	—	107	0,153	8,6	1 Tag Hunger
6a	18. XII.	2 20	31,3	0,02 n Natriumlactat	212	0,304	15,2	
7	25. IX.	3	10,9	—	70	0,100	11,8	2 Tage Hunger
7a	25. IX.	3	14,6	0,01 n Natriumlactat	125	0,180	15,6	
7b	25. IX.	3	13,6	0,02 n Alanin	112	0,160	15,0	
7c	25. IX.	3	17,3	0,02 n Asparagin	104	0,149	11,0	
8	5. X.	3	17,0	—	75	0,107	8,0	2 Tage Hunger
8a	5. X.	3	23,4	0,01 n Natriumlactat	187	0,27	14,6	
8b	5. X.	3	17,0	0,02 n Alanin	100	0,143	10,8	
8c	5. X.	3	16,0	0,02 n Asparagin	117	0,167	15,0	
9	14. XII.	2 45	40,8	—	224	0,320	10,0	2 Tage Hunger
9a	14. XII.	2 45	40,8	0,02 n Natriumlactat	342	0,498	15,2	

B. Kohlehydratbestimmungen.

Nr.	Vorher			Nachher			Kohlehydratänderung	Kohlehydratänderung auf Feuchtgewicht bezogen	Kohlehydratänderung in Proz. des Sauerstoffverbrauchs [ ] = Zunahme
	Schnittgewicht	Kohlehydrat	Kohlehydrat	Schnittgewicht	Kohlehydrat	Kohlehydrat			
	mg	mg	Proz.	mg	mg	Proz.	mg	Proz.	
1	29,1	0,560	1,92	25,7	0,405	1,575	— 0,063	— 0,245	— 30
1 a	35,9	0,620	1,73	16,0	0,370	2,31	+ 0,079	+ 0,49	[+ 60]
1 b	—	—	—	27,1	0,565	2,08	+ 0,072	+ 0,26	[+ 42]
2	19,7	0,315	1,60	26,2	0,127	0,49	— 0,283	— 1,10	— 130
2 a	31,9	0,48	1,57	24,2	0,230	0,95	— 0,147	— 0,63	— 36
2 b	—	—	—	26,5	0,435	1,65	+ 0,020	+ 0,075	[+ 7]
3	23,3	0,121	0,52	18,0	0,0313	0,17	— 0,063	— 0,35	— 50
3 a	20,2	0,103	0,51	14,2	0,136	0,95	+ 0,061	+ 0,43	[+ 45]
	—	—	—	19,1	0,234	1,22	+ 0,134	+ 0,70	[+ 65]
4	**19,2**	**0,121**	**0,63**	**37,6**	**0,097**	**0,25**	**— 0,143**	**— 0,38**	**— 48**
4 a	—	—	—	**31,7**	**0,102**	**0,32**	**— 0,098**	**— 0,31**	**— 44**
4 b	—	—	—	**27,0**	**0,354**	**1,31**	**+ 0,184**	**+ 0,68**	**[+ 50]**
4 c	—	—	—	**26,1**	**0,379**	**1,45**	**+ 0,214**	**+ 0,82**	**[+ 60]**
5	**19,2**	**0,315**	**1,64**	**23,0**	**0,132**	**0,55**	**— 0,263**	**— 1,14**	**— 144**
5 a	**25,7**	**0,46**	**1,79**	**20,8**	**0,123**	**0,59**	**— 0,232**	**— 1,10**	**— 160**
5 b	—	—	—	**18,7**	**0,43**	**2,3**	**+ 0,110**	**+ 0,59**	**[+ 41]**
5 c	—	—	—	**19,1**	**0,635**	**3,31**	**+ 0,309**	**+ 1,61**	**[+ 108]**
6	**34,6**	**0,90**	**2,59**	**28,0**	**0,073**	**2,59**	**— 0,065**	**— 0,23**	**— 45**
6 a	**64,8**	**1,98**	**3,04**	**31,3**	**1,13**	**3,61**	**+ 0,247**	**+ 0,79**	**[+ 87]**
7	**11,7**	**0,129**	**1,10**	**10,9**	**0,014**	**0,13**	**— 0,116**	**— 0,98**	**— 120**
7 a	—	—	—	**14,6**	**0,083**	**0,57**	**— 0,078**	**— 0,53**	**— 46**
7 b	—	—	—	**13,6**	**0,028**	**1,20**	**— 0,122**	**— 0,92**	**— 80**
7 c	—	—	—	**17,3**	**0,041**	**0,24**	**— 0,150**	**0,87**	**— 110**
8	**19,8**	**0,27**	**1,36**	**17,0**	**0,135**	**0,80**	**— 0,095**	**0,54**	**— 95**
8 a	**17,4**	**0,23**	**1,32**	**23,4**	**0,244**	**1,04**	**— 0,069**	**0,30**	**— 30**
8 b	—	—	—	**17,0**	**0,228**	**1,34**	**0**	**0**	**[0]**
8 c	—	—	—	**16,0**	**0,179**	**1,12**	**— 0,035**	**0,24**	**— 24**
9	**60,7**	**0,43**	**0,72**	—	—	—	—	—	—
9 a	**52,9**	**0,41**	**0,78**	**40,8**	**0,40**	**0,98**	**+ 0,094**	**+ 0,23**	**[+ 20]**

Versuchen dieser Art, die in die Tabelle aufgenommen sind (Versuch 7 und 8), schränkte das Natriumlactat selbst den Kohlehydratverbrauch nur stark ein, führte aber nicht zur Synthese. In einem Versuche verhielten sich Alanin und Asparagin ebenso, während in dem anderen ihre Wirkung nicht deutlich war. Die Versuche reichen daher nicht für eine bestimmte Entscheidung aus.

Wie schon einleitend hervorgehoben, ist von verschiedenen Autoren die Synthese des Zuckers aus Milchsäure bei Durchströmung der Warmblüterleber beobachtet worden. Doch wurden diese positiven Resultate nur an Lebern phlorrhizindiabetischer Hunde erzielt, aber nicht an Lebern, die lediglich durch Hunger glykogenarm gemacht waren. Demgegenüber synthetisiert, wie die Tabelle zeigt, das Lebergewebe von

Hungerratten, das in lactathaltiger Ringerlösung suspendiert ist, sehr leicht Kohlehydrat. Das liegt vielleicht an der ausgiebigeren Zufuhr der Milchsäure, vielleicht auch an vollkommenerer Sauerstoffsättigung, als sie bei Durchströmung der überlebenden Leber erreicht werden. Auch in diesen Versuchen wurde mehrmals Insulin angewandt; in einzelnen Fällen schien die Kohlehydratsynthese gefördert zu werden, das Resultat war aber nicht konstant.

In der Regel wurde die Atmung durch Lactatzusatz auf Q_{O_2} 15 bis 20 gesteigert. Die geringeren Werte (z. B. Versuch 1 und 3 müssen vielleicht auf mangelhaftere Beschaffenheit der Gewebsschnitte bezogen werden.

Auch hier wurden in einigen Versuchen Glykogen und niedere Kohlehydrate getrennt bestimmt. Doch habe ich diese Trennung in den Tabellen nicht durchgeführt, weil das dabei häufig beobachtete Resultat, daß der Glykogengehalt während des Versuchs stark abnimmt, der Gehalt der niederen Kohlehydrate aber zunimmt, offenbar auf die spezielle Methodik der Gewebsschnitte bezogen werden muß und insofern nicht physiologisch ist. Es würde dies der von *E. J. Lesser*[1]) beobachteten Hydrolyse des Glykogens bei Zerkleinerung der Kaltblüterleber entsprechen.

b) Versuche in Serum.

Schwerer ist es, aus dem Verhalten der Leberschnitte in Serum ein einheitliches Bild zu gewinnen. Da das Serum ja Zucker wie Milchsäure enthält, scheint es von einer Reihe schwer kontrollierbarer Umstände abzuhängen, ob die Spaltung oder Synthese überwiegt. In der Regel *verschwand* bei Lebern von Hungerratten in Serum Zucker, wenn auch nur etwa zur Hälfte des Sauerstoffverbrauchs; bei Zugabe von Lactat, in Konzentrationen von n/50, wodurch der Milchsäuregehalt etwa verdreifacht wird, wurde in der Mehrzahl der Fälle der Schwund verringert oder auch eine Synthese beobachtet. Auch in dieser Anordnung schien Insulinzusatz die Synthese zu fördern.

Die Atmungsmessung zeigt die großen Q_{O_2}-Werte der Hungerlebern in Serum. Durch Zusatz von milchsaurem Natrium wurden diese öfters noch weiter gesteigert, ebenso durch Insulinzusatz.

Schließlich sei noch auf einen Punkt hingewiesen: Weder die Zunahme noch Abnahme des Kohlehydratgehalts sagt allein etwas Bestimmtes über den Kohlehydratumsatz aus. Dies geschieht erst durch Kombination mit den anderen Methoden. Daß die Kohlehydrat*zunahme* aus der Milchsäure stammt, nicht aus Fett oder Eiweiß, kann nur aus dem Schwund des Lactats sowie aus der Abhängigkeit der Kohlehydratsynthese von dem Zusatz der Milchsäure gefolgert werden. Für das Zwerchfell sind in dieser Richtung besonders beweisend die

[1]) Diese Zeitschr. 52, 471, 1913.

Tabelle IX.

Versuche mit Hungerlebern in Serum.

A. Atmungsversuche.

Nr.	Datum	Versuchszeit	Schnittgewicht feucht mg	Zusätze zum Serum	O_2 cmm	O_2 mg	Q_{O_2}	Bemerkungen
1	22. VI.	3	26,5	—	240	0,345	16,6	Ratte 2 Tage Hunger
1 a	22. VI.	3	27,1	1×10^{-5} Insulin	345	0,495	23,5	
2	7. VII.	3	18,6	—	213	0,305	19	1 Tag Hunger
2 a	7. VII.	3	23,2	0,02 n Natriumlactat	325	0,460	23,2	1 „ „
2 b	7. VII.	3	17,2	0,02 n Natriumlactat + 5×10^{-6} Insulin	326	0,465	31,0	
3	15. VII.	3	18,2	—	235	0,335	21,5	1 Tag Hunger
3 a	15. VII.	3	17,0	0,02 n Natriumlactat	259	0,370	23,2	1 „ „
3 b	15. VII.	3	16,4	0,02 n Natriumlactat + 5×10^{-6} Insulin	282	0,404	28,5	1 „ „
4	15. VII.	3	13,4	—	190	0,274	24	1 „ „
4 a	15. VII.	3	27,2	0,05 Proz. Glucose	309	0,44	19,0	1 „ „
4 b	15. VII.	3	17,5	0,05 „ „ + 5×10^{-6} Insulin	246	0,350	23,5	1 „ „
5	21. VII.	3	20,8	—	208	0,297	16,5	2 Tage Hunger
5 a	21. VII.	3	30,0	0,02 n Natriumlactat + 3×10^{-6} Insulin	242	0,442	17,0	
5 b	21. VII.	3	26,0	0,02 n Natriumlactat	239	0,385	17,0	
6	25. VII.	3	22,4	0,02 n Natriumlactat	278	0,398	20,5	2 Tage Hunger
6 a	25. VII.	3	22,2	0,02 n Natriumlactat + 5×10^{-6} Insulin	292	0,418	21,6	

B. Kohlehydratbestimmungen.

Nr.	Vorher			Zucker in Versuchsmenge Serum (1 ccm)	Nachher		Berechnete Kohlehydrate für Anfangsgehalt	Kohlehydratänderung	Kohlehydratänderung in Proz. des Feuchtgewichts	Kohlehydratänderung in Proz. des O_2-Verbrauchs
	Schnittgewicht mg	Kohlehydrat mg	Kohlehydrat Proz.	mg	Schnittgewicht mg	Kohlehydrat mg		mg		
1	21,2	0,250	1,18	0,48	26,5	0,245	0,748	— 0,503	1,90	— 155
1 a	31,2	0,315	1,01	—	27,1	0,313	0,754	— 0,441	1,60	— 95
2	20,1	0,34	1,69	0,515	18,6	0,605	0,805	— 0,200	— 1,07	— 70
2 a	15,6	0,255	1,63	—	23,2	0,69	0,885	— 0,195	— 0,85	— 45
2 b	—	—	—	—	17,2	1,02	0,785	+ 0,235	+ 1,36	[+ 54]
3	16,5	0,216	1,31	0,352	18,2	0,41	0,59	— 0,18	— 1,0	— 60
3 a	21,8	0,310	1,42	—	17,0	0,524	0,583	— 0,06	— 0,35	— 17
3 b	—	—	—	—	16,4	0,618	0,574	+ 0,044	+ 0,265	[+ 12]
4	16,2	0,225	1,39	0,81	13,4	0,75	0,993	— 0,24	— 1,84	— 96
4 a	42,4	0,57	1,33	1,31	27,2	1,37	1,69	— 0,31	— 1,14	— 70
4 b	—	—	—	1,31	17,5	1,24	1,55	— 0,31	— 1,78	— 95
5	22,0	0,495	2,25	0,665	20,8	1,09	1,135	— 0,045	— 0,2	— 16
5 a	—	—	—	—	30,0	1,13	1,34	— 0,21	— 0,72	— 50
5 b	—	—	—	—	26,0	1,04	1,25	— 0,21	— 0,81	— 60
6	19,0	0,15	0,78	0,492	22,4	0,79	0,674	+ 0,116	+ 0,52	[+ 30]
6 a	24,5	0,21	0,85	—	22,2	0,81	0,67	+ 0,14	+ 0,63	[+ 35]

Versuche mit dialysiertem Serum, denn nur in diesem zuckerfreien Serum wird nach Zusatz von milchsaurem Natrium eine Synthese des Kohlehydrats beobachtet.

Schwindet das Kohlehydrat bei der Atmung, so kann daraus allein nicht entschieden werden, ob es zu einem Teile zu Milchsäure gespalten oder oxydiert ist. Dies kann auch nicht in jedem Falle durch alleinigen Vergleich mit dem „scheinbaren respiratorischen Quotienten“ der Atmung (γ) geschehen. Ist dieser z. B. 0,95 und in der entsprechenden Anordnung Kohlehydrat zu drei Viertel des Sauerstoffverbrauchs verschwunden, so kann drei Viertel der Oxydation durch Kohlehydrat, ein Viertel durch Eiweiß bedingt sein. Es kann aber auch gar kein Kohlehydrat oxydiert sein, sondern allein Fett mit dem respiratorischen Quotienten 0,70. Wenn das hier verschwundene Kohlehydrat zu Milchsäure gespalten ist, so entspricht dies einer Vergrößerung von γ um ein Drittel des Betrages, der für die Oxydation in Ansatz zu bringen ist (weil 1 Mol. Zucker durch Spaltung 2 Mol. CO_2, durch Oxydation 6 Mol. CO_2 frei macht). In unserem Beispiel würde der Quotient um 0,25 zunehmen, also auch 0,95 betragen. Erst der Vergleich mit dem Verhalten des Bicarbonats oder der chemischen Bestimmung des Milchsäuregehalts gestattet eine Entscheidung. Da bei Hungerratten sowohl im Lebergewebe als in der Muskulatur in zuckerfreier Lösung in der Regel nur eine sehr geringfügige Bicarbonatabnahme ($Q^{B}_{(M)} = -0{,}5$), d. h. Milchsäurezunahme erfolgt, die in der obigen Rechnung 10 Proz. des Sauerstoffverbrauchs entspricht, so muß der gemessene Kohlehydratschwund mindestens überwiegend auf Oxydation bezogen werden. Dagegen kann bei mangelhafteren Gewebsschnitten infolge teilweiser Anaerobiose eine stärkere Milchsäurebildung erfolgen. Dies dürfte die Ursache für die gelegentlich zu große Abnahme des Kohlehydratgehalts sein. Speziell in Serum ist in Sauerstoff unter normalen Umständen nur eine Bicarbonat*zunahme* nachweisbar. Es verschwindet hier also kein Kohlehydrat durch Spaltung.

Eine Reihe weiterer Versuche wurde mit der grauen Substanz des Rattenhirns gemacht. Das Rattengehirn enthält, wie schon von *Takahashi* (unter *Asher*) gefunden wurde[1]), nur sehr wenig Glykogen, in der Hauptsache niedere Kohlehydrate. Ich fand ersteres bestätigt; für die niederen Kohlehydrate erhielt ich erheblich höhere Werte, als von *Takahashi* angegeben, nämlich etwa 0,4 Proz. (statt 0,03 bis 0,08). Das dürfte an der verschiedenen Verarbeitung liegen, denn die spontane Milchsäurebildung setzt im Gehirn schon im Moment des Todes ein und verringert den Kohlehydratgehalt unmittelbar, wenn nicht besondere Kautelen ergriffen werden. In den ersten Versuchen glaubte

[1]) Diese Zeitschr. 154, 444, 1924.

ich festzustellen, daß bei Atmung in Ringerlösung Zusatz von Natriumlactat eine Zunahme an Kohlehydrat bewirkt, doch haben spätere Versuche dies nicht bestätigt, so daß der Verbrauch an milchsaurem Natrium in der Größe der Atmung lediglich auf Oxydation bezogen werden muß. Aus diesem Grunde sei auf die Mitteilung der Versuche verzichtet[1].

Herrn Dr. *Lohmann*, Assistenten der Abteilung, danke ich für seine Unterweisung in der Ausführung der chemischen Bestimmungen.

Zusammenfassung.

1. Im Zwerchfell von Hungerratten, die mehrere Stunden lang in reiner Ringerlösung atmen, deckt der Kohlehydratschwund höchstens die Hälfte des Sauerstoffverbrauchs in der Ruhe. Dazu kommt noch ein Milchsäureschwund von etwa 15 Proz. der Atmung. Der Rest der Oxydation muß auf Eiweiß und Fett bezogen werden. In Gegenwart von Lactat verschwindet Milchsäure, doch wird der Kohlehydratschwund hierdurch nur unbedeutend eingeschränkt, was vermutlich mit der Verletzung des Zwerchfellmuskels zusammenhängt. Bei Atmung des Zwerchfells in Serum steigt in der Regel der Kohlehydratverbrauch bei verhältnismäßig kleinem Milchsäureschwund. Vermehrt man den Milchsäuregehalt des Serums, so wird der Kohlehydratverbrauch eingeschränkt, und es kann sogar bei Wegdialysierung des Serumzuckers zu bilanzmäßig nachweisbarer Synthese von Kohlehydrat kommen. Der respiratorische Quotient, die Atmungsgröße und der Kohlehydratverbrauch steigen in Serum bei Zusatz von Insulin. In diesem Falle kann der Kohlehydratschwund annähernd mit dem Sauerstoffverbrauch korrespondieren, was durch erhöhte Oxydation des Zuckers erklärt werden muß.

2. In Leberschnitten von Hungerratten wird Milchsäure unter Steigerung der Atmung in großem Umfang zu Kohlehydrat synthetisiert, während ohne Lactat ein Kohlehydratverbrauch stattfindet, der im allgemeinen etwa der Hälfte des Sauerstoffverbrauchs entspricht, manchmal allerdings erheblich größer ist. Dies letztere muß auf Milchsäurebildung zurückgeführt werden. In Serum ist das gleiche Verhalten nachweisbar, doch ist wegen gleichzeitiger Anwesenheit von Zucker und Milchsäure das Verhalten weniger regelmäßig. Ohne besonderen Lactatzusatz zum Serum deckt der Zuckerverbrauch hier etwa 50 bis 100 Proz. der Oxydation. Bei Vermehrung des Lactatgehalts findet in der Mehrzahl der Fälle eine Kohlehydratsynthese statt.

[1]) Auf meine ersten Resultate ist der Hinweis von *O. Meyerhof* zurückzuführen (Naturwissensch. 13, 983, 1925), daß auch im Gehirn Spaltung und Synthese des Kohlehydrats zeitlich getrennt werden könnte. Diese Angabe ist daher nicht zutreffend.

Über Atmung und Kohlehydratumsatz tierischer Gewebe.

III. Mitteilung:

Über den Unterschied von d- und l-Milchsäure für Atmung und Kohlehydratsynthese im Organismus.

Von

O. Meyerhof und **K. Lohmann.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 19. März 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Zur Kenntnis des Reaktionsmechanismus, durch den die Synthese der Milchsäure zu Zucker zustande kommt, hat es Interesse, zu wissen, ob dabei zwischen der bei den höheren Organismen allein vorkommenden d-Milchsäure[1]) und ihrem optischen Antipoden Unterschiede bestehen. Über die Frage, ob l-Milchsäure vom tierischen Organismus überhaupt zu Zucker synthetisiert werden kann, existiert, soviel uns bekannt, nur ein einziger Versuch, und zwar mit positivem Resultat. *Dakin* und *Dudley*[2]) führten einem phlorrhizindiabetischen Hund Natrium-l-Lactat mit der Schlundsonde ein und beobachteten daraufhin Erhöhung der Zuckerausscheidung. Diese stieg in sechsstündigen Perioden bei Einfuhr von 12 g l-Milchsäure von 14,21 auf 20,68 g. Unter Zugrundelegung der Konstanz für den Wert D/N (Zuckerausscheidung : Stickstoffausscheidung) berechnen die Autoren eine Bildung von etwa 9 g Extraglucose. Das Resultat, daß die l-Milchsäure scheinbar ebensogut synthetisiert wird, wie die d-Milchsäure, spricht nach Ansicht der Autoren dafür, daß bei der Synthese eine inaktive Zwischenstufe durchschritten wird, als welche sie Methylglyoxal annehmen. Doch erschien uns dieser eine Versuch nicht hinreichend zur Klärung der Frage, ob wirklich l- und d-Milchsäure in ihrem Verhalten im Organismus

---

[1]) Die ältere Bezeichnung der rechtsdrehenden Fleischmilchsäure als d-Säure wird hier beibehalten.

[2]) Journ. of biol. Chem. 15, 143, 1913.

keine Unterschiede zeigen. Auch entscheidet das Schicksal im Gesamtorganismus natürlich nicht darüber, ob etwa die Fähigkeit zur Umwandlung in Zucker auf bestimmte Organe beschränkt ist.

Neben dem Versuch von *Dakin* und *Dudley* wird in der Literatur noch Bezug genommen auf die älteren von *Mandel* und *Lusk*[1]) über die Umwandlung von Milchsäure in Zucker beim phlorrhizindiabetischen Hunde, die indes in der uns beschäftigenden Frage keine Schlüsse zulassen. In zwei Versuchen mit racemischem Lactat fanden die Autoren eine Steigerung der Zuckerbildung, die sie berechnen im ersten Falle von 54,27 g Basalausscheidung auf 64,46 g, bei Zufuhr von 14,37 g Milchsäure, im zweiten Falle mit mehreren Versuchsperioden auf 3,3 und 4,35 g Extrazucker bei Zufuhr von 11 bzw. 10 g Milchsäure. Diese Rechnungen basieren auf der Annahme idealer Konstanz von $D/N = 3{,}65$. Indessen schwanken in den Anfangsperioden ihrer eigenen Versuche ohne Zusatz die Quotienten ebenso wie bei *Dakin* und *Dudley* zwischen 3,5 und 3,9. Würde man etwa in Versuch 1 den im gleichen Experiment gefundenen Basalwert von 3,79 zugrunde legen, so erhält man nur 8 g Extrazucker, also etwa die Hälfte der zugeführten Milchsäure. Ferner machten sie Versuche mit einem Präparat von d-Milchsäure und fanden bei ähnlichen absoluten Zahlen nach ihrer Rechnung dreimal eine Ausscheidung von Zucker im Betrage von 50 bis 60 Proz. der eingeführten Milchsäure; einmal bei Gesamtausscheidung von 27,4 g in 9 Stunden und Zufuhr von 3,4 g d-Lactat eine Extraglucosemenge von 3,7 g = 110 Proz. Es braucht nicht gesagt zu werden, daß der von ihnen in bedingter Form gezogene Schluß, daß eine vollständige Umwandlung der d-Milchsäure in Zucker möglich ist, aus diesem einzigen Versuch nicht gefolgert werden kann. Bei geringster Veränderung des Basiswertes D/N innerhalb der beobachteten Schwankungen kann man eine 50 Proz. kleinere Extrazuckerausscheidung berechnen. Es ist ebenso unmöglich, aus diesen Versuchen zu folgern, wie es geschehen ist, daß hier die d-Milchsäure wegen vollkommener Umwandlung in Glucose nicht einer teilweisen Oxydation unterliegen könnte, wie etwas darüber auszusagen, ob die beiden aktiven Milchsäuren in gleichem oder verschiedenem Umfang zu Zucker synthetisiert werden.

Daß vom niederen Organismus, insbesondere Hefe, auch l-Milchsäure verbraucht werden kann, ergibt sich aus den Versuchen von *Fürth* und seinen Schülern, nach denen Gärungsmilchsäure durch sauerstoffgeschüttelte Hefe nahezu restlos umgesetzt wird. Hierbei wird ein gewisser Teil derselben als nicht hydrolysierbares Kohlehydrat assimiliert[2]).

Den Ersatz der d-Milchsäure durch ihren optischen Antipoden haben wir bei allen Vorgängen geprüft, die durch Anwesenheit des milchsauren Natriums beeinflußt werden. Es sind dies, wie sich aus den bisherigen Arbeiten ergibt, Atmungsgröße, Kohlehydratbilanz (Synthese), Bicarbonatänderung (Milchsäureschwund) bei Frosch-

[1]) Amer. Journ. of Physiol. 16, 129, 1906.
[2]) Diese Zeitschr. 132, 165, 1922.

muskeln[1]), Säugetierleber[2]), Atmungsgröße und Milchsäureschwund bei der Säugetierhirnsubstanz und -niere[2]), Atmungsgröße beim Säugetiermuskel [Zwerchfell[1])], Atmungsgröße und C-Assimilation bei der Hefe[3]), schließlich auch Einfluß des Lactats auf die anaerobe Glykolyse des Gehirns. Es war dabei zu untersuchen, ob eine Differenz bei den verschiedenen Wirkungen der Milchsäure, etwa auf die Atmungsgröße und die Kohlehydratsynthese besteht oder eine solche bei den verschiedenen Organen. Die klarsten und am besten reproduzierbaren Resultate ergibt die manometrisch gemessene Bicarbonatvermehrung durch Schwund der Milchsäure, besonders deshalb, weil die chemisch nachweisbare Kohlehydratsynthese sowie die Steigerung der Atmung in stärkerem Maße von den Versuchsbedingungen abhängig sind. Weiter aber ist die Kohlehydratsynthese am leichtesten bei intakten Froschmuskeln festzustellen, die Wirkung auf die Atmung am regelmäßigsten in der grauen Hirnsubstanz, wo die Oxydation ohne Zucker und Lactat sehr rasch auf kleine Werte fällt, sowie ferner in der Niere, wo die Atmung am besten konstant ist. Andererseits ist die Steigerung der Atmung in der Leber zwar nicht so regelmäßig, aber häufig besonders groß. Relativ am schlechtesten reproduzierbar ist die Einwirkung des Lactats auf das Zwerchfell, wohl wegen der unausbleiblichen Verletzung des Muskels; die betreffenden Versuche sind hier nicht wiedergegeben.

Als allgemeines Resultat ergibt sich in unseren Versuchen, daß zwar bei der Hefe zwischen dem Umsatz von l- und d-Lactat nur ein geringer Unterschied besteht, in den tierischen Geweben dagegen diese Differenz sehr beträchtlich ist. Allerdings wird auch reines l-Lactat langsam oxydiert und in geringem Maße synthetisiert. Die Geschwindigkeit dieses Umsatzes ist aber nur ein Bruchteil der von d-Lactat. Entsprechend ist auch die Wirkung auf die Atmungsgröße gering und meist nicht mehr nachweisbar. Augenscheinlich ist der Unterschied der beiden Milchsäuren bei Säugetiergeweben noch größer als beim Froschmuskel.

Ausführung der Versuche.

1. Herstellung des Präparats.

Als l-Milchsäure verwandten wir solche, die nach der Vorschrift von *Irvine*[4]) mittels Morphin hergestellt war. Für einen Teil der Versuche diente ein älteres, nach dieser Vorschrift von Herrn Professor *Neuberg* zu anderen Zwecken angefertigtes und uns freundlichst über-

[1]) *O. Meyerhof, K. Lohmann, R. Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.
[2]) *O. Meyerhof, K. Lohmann*, ebendaselbst **171**, 381, 1926.
[3]) *O. Meyerhof*, ebendaselbst **162**, 43, 1925.
[4]) Journ. chem. soc. **89**, 935, 1906.

lassenes Präparat von kristallisiertem Zinklactat [$Zn(C_3H_5O_3)_2 + 2H_2O$], dessen spezifische Drehung = + 6,04° in 4proz. Lösung sich auch nach mehrfachem Umkristallisieren aus heißem Wasser nicht änderte. Die Differenz gegenüber der bei dieser Konzentration zu erwartenden spezifischen Drehung von + 7,5° mußte bei der im übrigen reinen Substanz auf einen Gehalt an racemischem Lactat von etwa 20 Proz. bezogen werden. Nach dem Ausfall der damit angestellten Versuche erschien es erwünscht, die Versuche mit l-Lactat zu wiederholen, das vollständig frei von seinem Antipoden war. Wir stellten daher selbst mittels einer größeren Menge Morphin, die uns von den Schering-Werken überlassen wurde, Zink-l-Lactat her, das innerhalb der Meßfehler die aus der Literatur zu erwartende spezifische Drehung ergab[1]). Das Präparat wurde in folgender Weise hergestellt:

Die benutzte Milchsäure (*Kahlbaum*) wird mit der zehnfachen Menge Wasser 6 Stunden am Rückflußkühler zur Zerstörung des Anhydrids gekocht, die heiße Lösung mit Morphin neutralisiert und filtriert. Die sich beim Abkühlen ausscheidenden Kristalle von Morphin-l-Lactat werden nacheinander mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Beim Einengen der Mutterlauge auf etwa die Hälfte scheidet sich eine zweite Fraktion ab. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus 50proz. Alkohol wird das Morphinsalz in Wasser gelöst und mit Ammoniak zersetzt, das NH_4-Salz in das Calciumsalz durch Kochen mit $Ca(OH)_2$ überführt, dieses mit der äquivalenten Menge Oxalsäure gefällt, die Lösung mit Tierkohle gekocht und filtriert. Nach dem Einengen, das nicht zu weit getrieben werden darf, um größere Verluste an Milchsäure und die Bildung rechtsdrehender Anhydride zu vermeiden, wird die Lösung in Alkohol-Äther (1 : 1) aufgenommen, filtriert und nach Verdampfen des Lösungsmittels mit frisch gefälltem, gut ausgewaschenem Zinkcarbonat, das aus analysenreinen Substanzen hergestellt ist, eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Die Fraktionen von Zink-l-Lactat werden bei 38° an der Luft getrocknet und auf Drehung, Wasser- und Zinkgehalt geprüft.

Für die spezifische Drehung des kristallisierten Zinklactats bestehen in dem Konzentrationsgebiet von 5 bis 7 Proz. eine Reihe gut übereinstimmender Messungen, die für die beiden spiegelbildlichen Salze ein $[\alpha]_D^{20} = \pm 6{,}83$ ergeben. Dies dürfte, zumal die Herstellung auf ganz verschiedenen Wegen erfolgte, der zuverlässigste Wert sein.

Es geben an *Hoppe-Seyler* und *Araki*[2]):

	$[\alpha]_D^{20}$
für 6,73 gew.-proz. Lösung Zink-d-Lactat (d-Milchsäure aus frischem Fleischextrakt) . . .	— 6,84
„ 5,89 gew.-proz. Lösung Zink-d-Lactat (d-Milchsäure aus frischem Fleischextrakt) . . .	— 6,83

[1]) Herrn Prof. *Neuberg* sind wir für das erstgenannte Präparat, Herrn Prof. *Schöller* in Firma Schering-Werke auf Aktien für die Herstellung eines anderen ähnlichen Präparats l-Lactat sowie die Überlassung einer größeren Menge Morphins zu Dank verpflichtet.

[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. 20, 371.

Purdie[1]):

	$[\alpha]_D^{20}$
für Zink-d-Lactat 7,47 proz. (fraktionierte Kristallisation von racemischem Zinkammoniumlactat) .	— 6,83
„ Zink-l-Lactat 7,48 proz. (Strychninmethode und fraktionierte Kristallisation).	+ 6,81

Irvine:

für Zink-l-Lactat: $c = 5{,}6$ Proz. (Morphinmethode).	+ 6,84
„ Zink-d-Lactat: $c = 7{,}1$ „ „ .	— 6,83

Die älteren Angaben von *Wislicenus*[2]) und *Schardinger*[3]), die teils eine etwas niedrigere, teils höhere Drehung verzeichnen, erscheinen weniger zuverlässig.

Bei Verdünnung der Lösung steigt die spezifische Drehung ziemlich rasch und beträgt für 4,18 Proz. nach *Hoppe-Seyler* und *Araki* + 7,55°, nach *Phelps* und *Palmer*[4]) für 3,5 Proz. wasserfreies Salz = 4,0 Proz. kristallisiertes Salz + 7,7° (für 6,93 Proz. wasserfreies d-Salz — 6,50°) nach *Jungfleisch* und *Godchot* für 2,5 Proz. wasserfreies d-Lactat — 8,0°[5]).

Unser eigenes Zinksalz ($+ 2\,H_2O$) ergab bei einer Konzentration $c = 6{,}00$ Proz. im 2-dm-Rohr eine Drehung im Spektralbezirk der *D*-Linie von + 0,811°, $[\alpha]_D^{20} = + 6{,}75°$, bei $c = 3{,}00$ Proz., Drehung + 0,487°, $[\alpha]_D^{20} = + 8{,}1°$.

Die Abweichungen von den Werten der anderen Autoren liegen innerhalb der Meßgenauigkeit. Eine weitere Probe auf Reinheit bietet die Bestimmung des Wassergehalts, da das aktive Salz mit zwei Wasser (= 12,88 Proz.), das racemische mit drei Wasser (= 18,18) kristallisiert. Während dementsprechend das andere Präparat einen Wassergehalt des lufttrockenen Salzes von 13,7 Proz. ergab, fanden wir bei dem von uns hergestellten Salze

lufttrocken (1 Tag bei 38°)	42,86 mg	
4 Stunden bei 115° getrocknet	37,34 „	
Differenz	3,52 mg	= 12,88 Proz.

Bestimmung des Zinkgehalts als ZnO:

kristallisierte Substanz	26,06 mg	
nach dem Glühen	7,57 „	= 29,08 Proz.
(berechnet	29,04 Proz.).	

Zum Umsatz in Natriumlactat wird das Zinksalz mit einem geringen Überschuß von Natriumcarbonat einige Zeit auf dem Wasserbade digeriert, filtriert, mit n HCl etwas überneutralisiert, zur Vertreibung des CO_2 einige Zeit erwärmt und, nachdem es genau mit Lackmus auf den Neutralpunkt eingestellt ist, in einem Meßkolben auf eine Konzentration von etwa n/5 bzw. n/10 verdünnt. Der Gehalt der Lösung an Milchsäure wird nach *Fürth* und *Charnas* in der üblichen Weise bestimmt.

Bei den folgenden Versuchen wird das von Herrn Professor *Neuberg* bezogene Salz mit I, unser eigenes mit II bezeichnet; alle entscheidenden Versuche werden mit dem letzteren wiederholt.

---

1) Journ. chem. soc. **68**, 1143.

2) Liebigs Ann. **167**, 332.

3) Winters Monatshefte **11**, 551.

4) Journ. Amer. chem. Soc. **39**, 136, 1917.

5) C. r. **140**, 719.

Zum Vergleich wird die Wirkung der d-Milchsäure trotz des darüber bereits vorliegenden, in den angeführten Arbeiten enthaltenen Versuchsmaterials in jedem einzelnen Falle unter gleichen Umständen geprüft. Für einen Teil der Versuche diente uns reines d-Lactat, das von Herrn Professor *O. Warburg*[1]) aus Carcinomgewebe dargestellt war und von dem uns eine Probe überlassen wurde. Da jedoch das d-Lactat mit dem racemischen Salze in seinem biologischen Verhalten übereinstimmte, benutzten wir wegen Mangels an Substanz später neutralisierte *Kahlbaum*sche Gärungsmilchsäure. Das Carcinompräparat (reines d-Lactat) wird im folgenden mit *C*, die Gärungsmilchsäure (d-l-Lactat) mit *G* bezeichnet; in den Tabellenköpfen wird sie auch als d-Milchsäure angeführt, da der l-Anteil die Wirkung nicht beeinflußt.

2. *Versuche mit Hefe.*

Wie früher gezeigt, steigert Gärungsmilchsäure die Atmung von in Salzlösung aufgeschwemmter Preßhefe etwa um das Achtfache. Bei Vergleich von d-Lactat (aus Carcinom) und l-Lactat I ergab sich ein zwar deutlicher, aber geringfügiger Unterschied, indem die Atmungsgröße bei gleicher Konzentration mit dem ersteren etwa 15 Proz. größer ist. Die Assimilation des Lactats wurde auf zwei Wegen gemessen, einmal durch das Sauerstoffdefizit, das bei vollständigem Umsatz gegenüber dem berechneten Sauerstoffverbrauch sich ergab, sowie aus der Zunahme der Trockensubstanz der Hefe. Beide für kurze Zeiträume verhältnismäßig ungenauen Methoden ergaben keine wesentlichen Differenzen zwischen beiden Salzen. Der Verlauf der Atmungsgröße bei solchem vollständigen Umsatz ist auf Kurve I dargestellt und in der Tabelle I eine Übersicht über die gemessenen Atmungsgrößen gegeben.

Tabelle I.

Steigerung der Hefeatmung durch d- und l-Milchsäure.

Nr.	Versuchstemperatur	Versuchszeit	Lactat, molare Konzentration	Benutztes Präparat als l-Lactat	Benutztes Präparat als d-Lactat	cmm O_2 ohne Zusatz	cmm O_2 mit d-Lactat	Vielfaches der Kontrolle	cmm O_2 mit l-Lactat	Vielfaches der Kontrolle	Differenz zwischen d- u. l-Lactat Proz.
1	20°	2h	0,025	I	C	22,1	205	9,8	172	7,8	16
2	20	1 30′	0,0075	I	C	30,5	186	6,05	150	5,0	19
3	20	2 5	0,0025	I	C	34	214	6,8	181	5,8	15
4	28	2	0,01	I	C	139	980	7,0	850	6,1	13
					G		978				
5	28	40	0,005	II	G	40,5	316	7,8	280	7,0	11

[1]) Diese Zeitschr. 160, 307, 1925.

Die Assimilation eines Teiles der Milchsäure ergibt sich aus den folgenden Bestimmungen:

Versuch 1 (s. auch Abb. 1). Zu je 1,5 ccm Hefesuspension in Atmungsgläschen werden nach Schluß der Hähne 0,5 ccm Lactat (etwa n/100 = 0,45 mg) eingekippt. Versuchstemperatur 20°. Bei totaler Oxydation des Lactats erwartet für den genauen Milchsäuregehalt des d-Salzes (Prä-

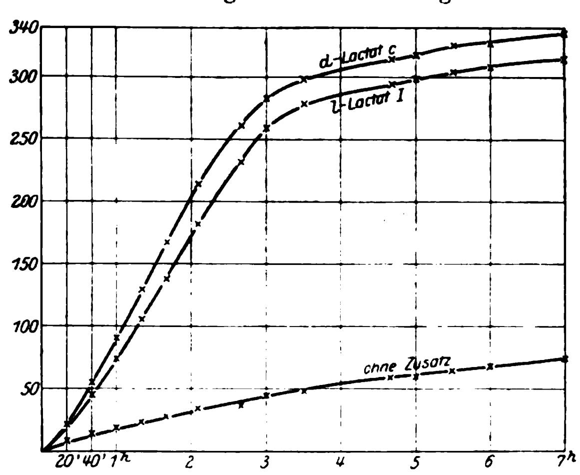


Abb. 1.
Sauerstoffverbrauch von Hefe in Phosphatlösung ohne Zusatz, mit *d*-Lactat und *l*-Lactat (n/400).
Bei dem Zeitpunkt 0 wird das Lactat in die Hefesuspension eingekippt. Nach etwa 3½ Stunden ist die Atmungsgröße auf die der Kontrolle gesunken, d. h. in beiden Fällen das Lactat vollständig verbraucht.

parat C) 371 cmm O_2, des l-Salzes (Präparat I) 328 cmm O_2; dazu der Sauerstoffverbrauch der milchsäurefreien Kontrolle. Nach etwa 4 Stunden sinkt der Sauerstoffverbrauch in beiden Lactatversuchen auf die Geschwindigkeit der Kontrolle. In 7 Stunden gemessen:

a) ohne Lactat 74 cmm O_2;

b) mit Lactat 336 cmm O_2; Überschuß 262 cmm O_2 statt 371 cmm O_2; synthetisiert Lactat entsprechend 109 cmm O_2 oder 0,15 mg Zucker;

c) mit l-Lactat 321 cmm O_2; Überschuß 247 cmm O_2 statt 328 cmm O_2; synthetisiert Lactat entsprechend 81 cmm O_2 oder 0,12 mg Zucker.

Versuch 2. Trockengewicht von je 2 ccm Hefesuspension (28°):

a) vor der Atmung	6,77 mg	
b) nach zweistündiger Atmung ohne Zusatz bei 28° (139 cmm O_2)	6,69 „	— 0,08 mg
c) mit n/100 d-Lactat (980 cmm O_2)	7,81 „	+ 1,04 „
d) mit n/100 l-Lactat (850 cmm O_2)	7,35 „	+ 0,58 „

Versuch 3. Trockengewicht:

a) vor der Atmung	4,03 mg	
b) nach vierstündiger Atmung bei 28° mit n/100 d-Lactat (920 cmm O_2)	4,74 „	+ 0,71 mg
c) mit n/100 l-Lactat (865 cmm O_2)	4,95 „	+ 0,92 „
d) mit 0,015 essigsaurem Natrium (1020 cmm O_2)	4,85 „	+ 0,82 „

Versuch 3 zeigt auch die *C*-Assimilation aus essigsaurem Natrium, die bisher noch nicht direkt nachgewiesen wurde. Auf die Unterschiede in der Trockengewichtszunahme in den einzelnen Lactatversuchen darf kein großes Gewicht gelegt werden; die Versuche sind nicht sehr genau wegen der Schwierigkeit, die geringen Hefemengen von der salzhaltigen Suspensionslösung vor dem Trocknen vollständig zu befreien, ohne mit destilliertem Wasser Stoffe aus der Hefe auszulaugen und an der Gefäßwand haftende Hefezellen zu verlieren.

3. Versuche mit Froschmuskeln.

Bei Suspension isolierter Froschmuskeln in milchsäurehaltiger Ringerlösung steigt die Atmungsgröße beträchtlich, wobei die in der Lösung befindliche Milchsäure vom Muskel zu Glykogen synthetisiert wird[1]). Bei Sartorien beträgt diese Steigerung 70 bis 180 Proz. Die Synthese des Kohlehydrats steht mit der Atmungssteigerung in der durch den Oxydationsquotienten gegebenen quantitativen Beziehung: Es wird etwa viermal so viel Milchsäure zu Kohlehydrat synthetisiert, als durch den Mehrverbrauch an Sauerstoff hätte verbrannt werden können. Die Genauigkeit der Methode wird etwas dadurch beeinträchtigt, daß symmetrische Muskeln oft nicht genau gleich stark atmen und daß in der Anfangszeit der Versuche, etwa 2 Stunden, die Atmungsgröße gegenüber dem späteren Ruhewert oft beträchtlich erhöht ist. Zur Berechnung kommen nur solche Versuche in Betracht, bei denen in der Hauptperiode die Kontrollmuskeln bei 20⁰ eine normale Atmungsgröße zwischen 24 und 40 cmm O_2 pro Gramm und Stunde besitzen.

Unsere jetzigen Versuche wurden ausschließlich mit Sartorien von Temporarien angestellt. Wegen der kleinen Kohlehydratmenge bedienten wir uns der *Hagedorn-Jensen*-Zuckerbestimmung. Da nach früheren Erfahrungen der Gehalt an niederen Kohlehydraten sich wenig ändert, wurde allein das Glykogen bestimmt. Die Versuche wurden nur 5 bis 6 Stunden fortgesetzt. Die Kohlehydratsynthese ist dann im Vergleich zu den Kontrollmuskeln nicht sehr groß, kann aber doch deutlich gemessen werden. Als weitere Methode kommt auch hier die Bestimmung des Milchsäureschwunds durch Bicarbonatzunahme in Betracht. Für die Atmungsmessungen wurden in jeder Serie vier Bestimmungen angesetzt, wobei die symmetrischen Muskeln des einen Frosches für den Vergleich mit und ohne d-Lactat, die des anderen

[1]) *O. Meyerhof, K. Lohmann, R. Meier,* diese Zeitschr. 157, 459, speziell S. 466, 1925.

für den Vergleich mit und ohne l-Lactat dienten. In einigen Fällen wurde direkt d- und l-Lactat an symmetrischen Muskeln verglichen. Gelegentlich wurden hier die Musculi semitendinosi zur Kontrollatmung benutzt. Das Ergebnis der Versuche ist, daß auch l-Lactat in meßbarem Umfang verbraucht und zu Kohlehydrat synthetisiert wird, jedoch mit einer Geschwindigkeit, die nur höchstens ein Viertel derjenigen von d-Lactat beträgt. Die Atmungssteigerung ist unter diesen Umständen so klein, daß sie oft schon in die Fehlerbreite fällt; sie entspricht aber im allgemeinen dem Milchsäureschwund und der Kohlehydratsynthese, so daß also der Oxydationsquotient von normaler Größenordnung ist. Entscheidend sind auch hier nur die Versuche mit l-Lactat II, immerhin nimmt die Wirkung des Lactats so stark mit sinkender Konzentration ab, daß das unreine Präparat I ein sehr ähnliches Resultat gab. Die Froschmuskeln wurden für die Atmungsmessung in Ringer-Phosphat (p_H 7,4) im Verhältnis 20 : 1 suspendiert. Bei der Berechnung der Atmungsgröße pro Gramm Feuchtgewicht und Stunde wurde die Anfangszeit wegen der Atmungssteigerung vernachlässigt.

Die Bicarbonatzunahme während der Atmung wurde, wie in den Versuchen der voranstehenden Arbeiten, in Sauerstoff mit 5 proz. CO_2 gemessen unter Zusatz von etwas Bicarbonat zur Ringerlösung. Der Bicarbonatanfangsgehalt wurde an den symmetrischen Muskeln ermittelt.

Tabelle II.

Atmungssteigerung mit d- und l-Milchsäure.

Nr.	Datum	Sartorien jeder Seite		Lactatzusatz			cmm O_2 pro g u. Std.			Steigerung mit d-Lactat	Steigerung mit l-Lactat
		Zahl	Gewicht g	Molare Konzentration	Präparate d	Präparate l	ohne Zusatz	mit d-Lactat	mit l-Lactat	Proz.	Proz.
1	30. XI.	2	0,36	0,02	C		36,5	86	—	135	—
1a	30. XI.	2	0,36	0,02		I	35	—	36,2	—	5
2	3. III.	1	0,191	0,02	G		26,5	64	—	140	—
2a	3. III.	1	0,210	0,02		II	24,7	—	30,1	—	20
3	8. III.	1	0,175	0,02	G		33,5	59	—	75	—
3a	8. III.	1	0,131	0,02		II	34	—	40,5	—	15
4	10. III.	1	0,165	0,02		II	34	—	36,2	—	7
5	10. III.	1	—	0,02	G	II	—	73,5	30	145	—

Tabelle III.

Bicarbonatzunahme (= Milchsäureschwund) bei der Muskelatmung mit d- und l-Milchsäure.

Nr.	Datum	Sartorien Zahl	Sartorien Gewicht g	Lactatzusatz Molare Konzentration	Präparate d	Präparate l	Versuchszeit Stdn.	Bicarbonatzunahme mit d-Lactat cmm	Bicarbonatzunahme mit l-Lactat cmm	Bicarbonatzunahme pro g und Std.*) mit d-Lactat cmm	Bicarbonatzunahme pro g und Std.*) mit l-Lactat cmm
1	10. XII.	2	0,32	0,013	G		4	128	—	**100**	—
1 a		2	0,29	0,013		I	4	—	34	—	**29**
2	5. I.	1	0,185	0,02	G		6	69,5	—	**63**	—
2 a		1	0,185	0,02		I	6	—	29,8	—	**27**
3	11. II.	2	0,345	0,01	G		5	200	—	**116**	—
3 a		2	0,365	0,01		I	5	—	75	—	**41**
4	27. II.	1	0,19	0,01	G		$4^1/_2$	66,7	—	**78**	—
4 a		2	0,344	0,02		II	$4^1/_2$	44,5	—	—	**29**

*) Entsprechend dem bisherigen Brauch sind alle Berechnungen bei Froschmuskeln auf das Feuchtgewicht (g) bezogen, dagegen bei Rattengeweben auf das Trockengewicht (mg). Bei Division der Zahlen der letzten Spalte durch 200 erhält man den $Q^{B}_{(M)}$-Wert der anderen Tabellen.

Bei der Ausführung der Glykogenbestimmungen in Sartorien folgten wir den in der voranstehenden Arbeit I gemachten Angaben. Die Ringerlösung, die als glykogenfrei angesehen werden darf, wurde nicht mit verarbeitet. Zu jedem Versuch diente nur ein einziger Sartorius.

Tabelle IV.

Kohlehydratsynthese mit d- und l-Milchsäure bei der Atmung von Froschmuskeln.

A. Versuchsdaten.

Nr.	Datum	Sartoriengewicht g	Lactatzusatz Molare Konzentration	Lactatzusatz Präparat	Versuchszeit Stdn.	O_2 cmm	O_2 mg	Glykogen nachher mg	Glykogen nachher Proz.
1	5. I.	0,185	—	—	6	—	—	1,67	0,91
1 a	5. I.	0,185	0,02	d (G)	6	—	—	1,79	0,97
2	5. I.	0,185	—	—	6	—	—	0,58	0,32
2 a	5. I.	0,185	0,02	l (I)	6	—	—	0,64	0,35
3	3. III.	0,191	—	—	5	29	0,0415	1,97	1,03
3 a	3. III.	0,191	0,02	d (G)	5	72	0,103	2,29	1,19
4	3. III.	0,21	—	—	5	28,6	0,041	2,09	0,99
4 a	3. III.	0,21	0,02	l (II)	5	37,3	0,0534	2,16	1,03
5	10. III.	0,15	0,02	d (G)	5	63,5	0,091	1,80	1,20
5 a	10. III.	0,15	0,02	l (II)	5	23,2	0,033	1,63	1,085

B. Berechnung der Versuche.

Nr.	d-Lactat					l-Lactat				
	O_2-Mehrverbrauch mg	Glykogenzunahme mg	Glykogenzunahme Proz.	Synthese berechnet (einschl. Oxydat.) mg	Oxydationsquotient ca.	O_2-Mehrverbrauch mg	Glykogenzunahme mg	Glykogenzunahme Proz.	Synthese berechnet (einschl. Oxydat.) mg	Oxydationsquotient ca.
1a	—	0,12	0,06	—	—	—	—	—	—	—
2a	—	—	—	—	—	—	0,06	0,03	—	—
3a	0,061	0,32	0,16	0,375	6,2	—	—	—	—	—
4a	—	—	—	—	—	0,012	0,07	0,04	0,08	(7)
5a	0,058	0,17	0,115	0,224	4,1	—	—	—	—	—

4. Versuche mit Säugetierleber.

Noch ausgesprochener sind die Differenzen zwischen l- und d-Lactat bei Säugetiergeweben. Zwar lassen sich auch hier Anhaltspunkte dafür gewinnen, daß l-Milchsäure in geringem Maße verbraucht wird. Der Umsatz ist aber so klein, daß speziell bei der Leber mit reinem l-Lactat eine die Fehlergrenzen überschreitende Steigerung der Atmung sowie ein durch Bicarbonatzunahme zu messender Milchsäureschwund und schließlich eine Kohlehydratsynthese nicht mehr mit Sicherheit festgestellt werden können. Immerhin ist eine Wirkung insofern zu beobachten, daß der Kohlehydratverlust in Gegenwart von l-Milchsäure kleiner ist als ohne Zusatz, so daß also wohl eine geringe Synthese in vivo möglich ist. Bei Benutzung des unreinen Präparats I war natürlich der Unterschied nicht so groß, aber auch hier war eine die Fehlergrenzen überschreitende Erhöhung der Atmung nicht zu beobachten.

Tabelle V.

Atmungsgröße des Lebergewebes von Hungerratten.

Nr.	Datum	Lactatzusatz			Versuchszeit	Q_{O_2}			
		Molare Konzentration	Präparat d	Präparat l		ohne Zusatz	mit 0,1 proz. Glucose	mit d-Lactat	mit l-Lactat
1	2. XII.	0,01	C	I	2h	10,8	10,8	17,9	10,0
2	3. XII.	0,015	C	I	2	—	13,4	18,4	12,8
3	4. XII.	0,012	C	I	1 30′	—	9,6	22,9*)	9,35*)
4	14. XII.	0,02	G	I	1	11,2	11,1	17,0	12,9
5	2. III.	0,015	G	II	1	8,0	—	16,8	7,3
6	5. III.	0,015	G	II	2	9,2	—	17,35	10,2

*) Mit Glucosezusatz.

Während noch in dem Präparat I, das 10 Proz. d-Lactat enthielt, öfters ein Milchsäureverbrauch bestimmt werden konnte, war dies mit Präparat II nicht mehr der Fall. Vielmehr nahm hier stets der Bicarbonatgehalt der Lösung geringfügig ab. Es war also keine Milchsäure verschwunden, sondern noch etwas hinzu gebildet worden, wie in lactatfreier Ringerlösung (Tab. VI).

Tabelle VI.

Bicarbonatänderung (Milchsäureumsatz) mit d- und l-Lactat bei Lebern von Hungerratten.

Nr.	Datum	Lactatzusatz			Versuchszeit	Schnittgewicht	Bicarbonatänderung	$Q^{B}_{(M)}$	
		Molare Konzentration	Präparat d	Präparat l	Stdn.	mg	cmm	mit d-Lactat	mit l-Lactat
1	3. XII.	0,014		I	2	5,22	+ 7	—	+ 0,67
1a	3. XII.	0,014	C		2	4,94	+ 25	+ 2,55	—
2	2. III.	0,015		II	3	5,5	— 7,1	—	— 0,4
2a	2. III.	0,015	G		3	8,0	+ 7,7	+ 0,33	—
3	4. III.	0,015		II	3	6,9	— 6	—	— 0,3
4	5. III.	0,015		II	2	5,1	— 6,6	—	— 0,7
4a	5. III.	—	G		2	3,9	+ 15,8	+ 2,00	—

Das gleiche zeigt die chemische Kohlehydratbestimmung (Tab. VII). Im Gegensatz zu dem racemischen Lactat bleibt mit reinem l-Lactat (II) eine Kohlehydratsynthese aus, oder es erfolgt eine geringe Abnahme; allerdings ist diese weniger groß wie mit lactatfreier Lösung. Die Anstellung und Berechnung der Versuche geschah wie in der voranstehenden Arbeit von *Takane*.

Tabelle VII.

Kohlehydratbilanz des Lebergewebes mit d- und l-Lactat.

A. Kohlehydratbestimmung und Atmung.

Nr.	Datum	Versuchszeit	Lactatzusatz		Feuchtgewicht	O_2	Q_{O_2} im Durchschn. d. Versuchszeit	Bestimmung	Kohlehydrat	Kohlehydrat	
			Molare Konzentration	Präparat	mg	cmm			mg	vorher Proz.	nachher Proz.
1	14. XII.				60,7			vorher	0,43	0,72	
1a					52,9			„	0,41	0,78	
1b		2h45′	0,02	d G	40,8	342	15,2	nachher	0,40		0,98
1c			0,02	l I	60,4	391	11,7	„	0,38		0,63
2	18. XII.				34,6			vorher	0,90	2,59	
2a					64,8			„	1,98	3,04	
2b		2 20	—	—	28,0	107	8,2	nachher	0,73		2,59
2c			0,02	d G	31,3	212	14,5	„	1,13		3,61
2d			0,02	l I	49,4	238	10,4	„	1,45		2,90
3	1. III.				45,5			vorher	0,217	0,48	
3a					34,2			„	0,167	0,49	
3b		3		—	25,0	156	10,4	nachher	0,098		0,39
3c			0,15	d G	34,5	258	12,5	„	0,211		0,61
3d			0,15	l II	44,3	216	8,2	„	0,224		0,505
4	4. III.				36,4			vorher	0,264	0,73	
4a					43,7			„	0,336	0,77	
4b		3		—	27,4	163	10,0	nachher	0,178		0,65
4c			0,15	d G	42,0	325	13,0	„	0,66		1,57
4d			0,15	l II	32,4	203,5	11,0	„	0,217		0,675

B. Berechnung der Versuche.

Nr.	Ohne Zusatz: Kohlehydratänderung mg	Ohne Zusatz: Kohlehydratänderung Proz.	Ohne Zusatz: Kohlehydratänderung in Proz. des O_2-Verbrauchs	d-Lactat: Kohlehydratänderung mg	d-Lactat: Kohlehydratänderung Proz.	d-Lactat: Kohlehydratänderung in Proz. des O_2-Verbrauchs	l-Lactat: Kohlehydratänderung mg	l-Lactat: Kohlehydratänderung Proz.	l-Lactat: Kohlehydratänderung in Proz. des O_2-Verbrauchs
1	—	—	—	+0,094	+ 0,28	+ 20	—0,073	—0,12	— 14
2	- 0,064	- 0,28	— 45	+0,247	+ 0,79	+ 86	+0,040	+0,08	+ 12
3	- 0,026	- 0,105	— 12	+0,041	+ 0,18	+ 37	+0,009	+0,02	+ 3
4	- 0,027	- 0,10	— 12	+0,344	+ 0,82	+ 78	—0,024	—0,075	— 9

5. *Versuche mit Nierengewebe.*

Bei den übrigen Säugetiergeweben beschränkten wir uns auf die Messung der Atmungsgröße und der Bicarbonatänderung. Am Nierengewebe ergibt sich mit dem reinen l-Lactatpräparat eine geringe, aber deutliche Steigerung der Atmung und jedenfalls auch in *einem* Versuch eine kleine Bicarbonatzunahme, wenn auch erheblich schwächer als mit Gärungsmilchsäure.

Tabelle VIII.

Atmungsgröße des Nierengewebes mit d- und l-Lactat.

Nr.	Datum	Lactatzusatz: Molare Konzentration	Lactatzusatz: Präparat d	Lactatzusatz: Präparat l	Versuchszeit Min.	Q_{O_2} ohne Zusatz	Q_{O_2} mit Glucose	Q_{O_2} mit d-Lactat	Q_{O_2} mit l-Lactat
1	5. XII.	0,014	G	I	80	—	18,3	29,4	22,6
2	1. III.	0,015	G	II	90	19,25	—	28,6	24,8
3	2. III.	0,015	G	II	60	20,4	19,5	36,5	21,4

Tabelle IX.

Bicarbonatänderung (Milchsäureschwund) im Nierengewebe mit d- und l-Lactat.

Nr.	Datum	Lactatzusatz: Molare Konzentration	Lactatzusatz: Präparate d	Lactatzusatz: Präparate l	Versuchszeit	Schnittgewicht feucht mg	Bicarbonatänderung cmm	$Q^{B}_{(M)}$ mit d-Lactat	$Q^{B}_{(M)}$ mit l-Lactat
1	2. III.	0,015	G		80′	21,8	+ 41,7	+ 7,2	
1a	2. III.	0,015		II	80	25,3	— 4,1		—0,6
2	6. III.	0,012	G		2h	14,8	+ 24	+ 4,05	
2a	6. III.	0,012		II	2	15,7	+ 7,3		+ 1,1

6. *Versuche mit der grauen Hirnsubstanz.*

Das Verhalten der Atmung der grauen Hirnsubstanz ist für die hier behandelte Frage besonders beweisend, weil die Atmung der Rinden-

substanz ohne jeden Zusatz im Laufe von 2 Stunden stark abfällt, während sie mit Glucose oder milchsaurem Natrium für etwa 2 Stunden fast konstant ist. Eine Reihe von Atmungskurven der grauen Hirnsubstanz ist in der Arbeit von *R. O. Loebel*[1]) angegeben. Zum Vergleich ist auf Abb. 2 der Atmungsverlauf in Gegenwart von d,l-Lactat (Gärungsmilchsäure) und reinem l-Lactat (Präparat II) dargestellt, sowie ohne Zusatz und mit Glucose. Man sieht, daß die Atmung mit

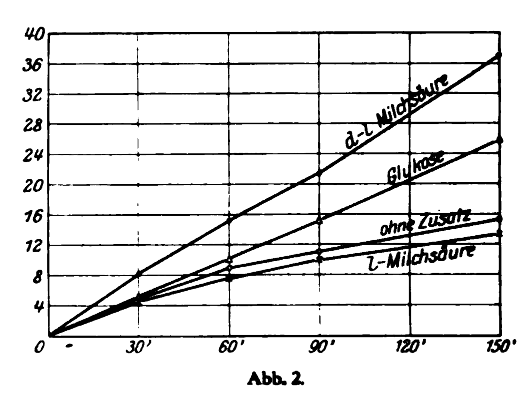


Abb. 2.
Atmungsgröße der grauen Hirnsubstanz (cmm pro mg Trockengewicht) in Ringerlösung mit Zusätzen.

l-Lactat ebenso abfällt wie in reiner Ringerlösung, während sie mit Gärungsmilchsäure mindestens ebenso groß, in den hier wiedergegebenen Versuchen zufällig noch größer ist als mit Glucose. Dieses Resultat wurde mehrfach erhalten, bei dem unreinen Präparat I jedoch nur bei niedrigeren Konzentrationen. Ebenso ist auch ein Milchsäureschwund in der grauen Hirnsubstanz, meßbar an der Zunahme des Bicarbonats, mit dem reinen l-Lactat nicht mehr nachweisbar. Für die Versuche an Hirnsubstanz wurden ernährte Ratten verwandt.

Tabelle X.

Atmungsgröße der grauen Hirnsubstanz.

Nr.	Datum	Lactatzusatz			Versuchszeit	Q_{O_2}			
		Molare Konzentration	Präparat			ohne Zusatz	mit Glucose	mit d-Lactat	mit l-Lactat
			d	l					
1	12. II.	0,01	G	I	2h	3,25	—	11,9	5,3
1 a	12. II.	0,002	G	I	2	3,25	—	7,2	3,1
2	2. III.	0,02	G	II	1	6,3	10,0	13,3	4,0
3	5. III.	0,02	G	II	2h30'	6,2	10,4	14,9	5,5

[1]) Diese Zeitschr. 161, 219, 1925.

Tabelle XI.

Bicarbonatänderung (Milchsäureschwund) in der grauen Hirnsubstanz mit d- und l-Lactat.

Nr.	Datum	Lactatzusatz			Versuchszeit	Schnittgewicht	Bicarbonatänderung	$Q^{B}_{(M)}$	
		Molare Konzentration	Präparat					mit d-Lactat	mit l-Lactat
			d	l	Min.	mg	cmm		
1	2. XII.	0,01	C		90	4,98	+ 28	+ 3,8	
2	6. III.	0,012	G		90	2,60	+ 8,1	+ 2,1	
2a	6. III.	0,012		II	90	2,79	— 3,2		— 0,75

Abweichend von dem bisherigen verhält sich allein die Beeinflussung der anaeroben Glykolyse durch Lactat: Diese sinkt nämlich auch bei Zusatz von reiner l-Milchsäure ebenso wie mit d-Milchsäure auf die Hälfte gegenüber Traubenzucker-Ringerlösung. Bei dieser Beeinflussung der Glykolyse handelt es sich also offenbar nicht um einen Prozeß, der mit der physiologischen Rolle der Milchsäure zusammenhängt.

Beispiel (8. März 1926).

Anaerobe Glykolyse pro 1 Stunde.

$Q^{(N_2)}_{M}$ ohne Zusatz . . . . + 1,9

$Q^{(N_2)}_{M}$ mit 0,2 Proz. Glucose . . . . + 9,2

$Q^{(N_2)}_{M}$ mit 0,2 Proz. Glucose + 0,02 n d,l-Lactat . . . . + 4,4

$Q^{(N_2)}_{M}$ mit 0,2 Proz. Glucose + 0,02 n l-Lactat . . . . . + 3,6

Zusammengefaßt ergibt sich, daß insbesondere beim Warmblüter zwar in einzelnen Geweben ein geringfügiger Umsatz der l-Milchsäure beobachtet werden kann, der Unterschied der Geschwindigkeit ist aber gegenüber der d-Milchsäure außerordentlich beträchtlich, so daß auch hier wie in anderen Fällen die starke Bevorzugung der im Stoffwechsel vorkommenden aktiven Form gegenüber ihrem optischen Antipoden gewahrt ist. Bei der Hefe dagegen ist der Unterschied äußerst geringfügig und vielleicht auch beim Froschmuskel nicht ganz so groß wie beim Warmblüter.

Die Beeinflussung der Harnausscheidung des normalen Organismus durch Insulin.

Von

J. A. Collazo und **Minko Dobreff.**

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 7. März 1926.)

In einer früheren vorläufigen Mitteilung (1) berichteten wir über Beobachtungen auf die Harnausscheidung nach intravenöser Insulininjektion, die wir im akuten Versuch am Hunde angestellt hatten. Diese ersten Orientierungsversuche gaben nicht ganz eindeutige Resultate. Um ungünstige Nebenwirkungen auf den normalen Mechanismus der Urinausscheidung, die in solchen Fällen durch die Narkose hervorgerufen werden können, auszuschalten, haben wir weitere Versuche angestellt, bei denen die Wirkung des Insulins auf die Harnausscheidung durch die Nieren unter möglichst physiologischen Verhältnissen studiert wurde. Wir stellten Insulinversuche an Hunden mit permanenter Harnblasenfistel an. Bei dieser zweiten Versuchsserie bekamen wir bei genügender Insulindosierung *eine deutliche, wenn auch rasch vorübergehende Steigerung der Diurese.*

Der diabetische Organismus verliert mit der Zeit — wie wir wissen — allmählich sein Wasserbindungsvermögen. Es gelingt aber, wie dies die klinischen Beobachtungen wiederholt gezeigt haben, durch eine entsprechende Insulinbehandlung, diesen veränderten Wasserhaushalt zu regulieren, und so kommt es durch Wasserretention zu einer starken Körpergewichtszunahme. *Gigon* und *Staub* (2) sowie auch *Pollak* (3) fanden, daß die zur Ausscheidung gelangende Wassermenge bei mit Insulin behandelten Diabetikern stark absinkt. Diese wasserretinierende Insulinwirkung zeigt sich sogar oft (l. c., *Pollak*) bei Dosen, die sich als nicht genügend, um die Glykosurie zu beeinflussen, erwiesen hatten. Nach *Gigon* (l. c.) sieht man aber oft nach dem Aufhören mit der Insulintherapie eine Polyurie auftreten. *Vollmer* und *Serebrijnski* (4) berichten über Versuche über den Einfluß des Insulins auf den Wassersalzhaushalt des nicht diabetischen Organismus. Sie fanden bei normalen nüchternen Kaninchen nach subkutaner bzw. intramuskulärer Insulinapplikation eine Hyperchlorämie und Hydrämie. Sie fanden weiter die Wirkung des Insulins im *Volhard-*

schen Wasserversuch als stark antidiuretisch. In der später erschienenen Arbeit von *Klissiuins* (5) wird die Wirkung des Insulins auf die Diurese vollkommen geleugnet. *Collazo* und *Händel* (6) untersuchten die Insulinwirkung auf die Diurese bei einem gesunden Hund. Das spezifische Gewicht des Harns bei ihren Versuchen sank — wenn auch nicht beträchtlich — an den Tagen, an welchen Insulin gespritzt wurde, während die Urinausscheidung ganz wenig oder gar nicht anstieg. Es wurde zuletzt von *Drabkin*, *Pagen Edwards* (7) bei narkotisierten normalen Hunden eine deutliche Zunahme der Diurese nach Insulinapplikation beobachtet.

Wie wir sehen, ist die Frage nach der Beeinflussung der Nierentätigkeit durch Insulin immer noch nicht endgültig gelöst. Die vorliegenden experimentellen Untersuchungen stellen einen Beitrag hierzu dar.

Methodisches.

Die akuten Versuche stellten wir an Hunden an, an denen unter Narkose nach Laparotomie und Einlegen einer Glaskapillare in den Ductus pancreaticus — es sollte auch gleichzeitig damals der Einfluß des Insulins auf die äußere Sekretion des Pankreas untersucht werden — durch einen zweiten Bauchschnitt die Harnblase frei präpariert wurde; an ihrem unteren Pol wurde durch Schnitt und Beutelnaht eine Glasröhre befestigt. So konnte der durch die beiden Ureteren einströmende Urin, statt sich in der Blase zu sammeln, direkt durch das Glasrohr in einem Gefäß gesammelt werden.

Das bei diesen akuten Versuchen gebrauchte Insulin (*Casimir Funk*) wurde in die frei präparierte Vena femoralis dextra injiziert.

Die zweite Serie von Versuchen wurde an Hunden mit permanenter Harnblasenfistel nach *Borodenko* [über Technik siehe auch bei *Dobreff* (8)] ausgeführt. Die Versuchstiere bekamen immer ein und dasselbe Futter. Damit jede digestive Nachwirkung ganz ausgeschaltet werde, wurden die Versuchshunde immer 15 bis 18 Stunden vor den Versuchen nüchtern gehalten. Wie das Futter, so war auch die den Hunden täglich gegebene Wassermenge stets dieselbe. Es wurde dafür gesorgt, daß die Hunde während der Versuche sich im Gestell ruhig verhielten; auf diese Weise wurde eine depressive Beeinflussung der psychischen Aufregung der Nierentätigkeit — wie das Untersuchungen *Dobreffs* (9) gezeigt haben — vermieden. Bei dieser letzten Serie von Versuchen wurde den Harnblasenfistelhunden nur einmal am Tage Insulin injiziert und die Harnabsonderung nach der Injektion mit der vor der Injektion verglichen. Das bei diesen Versuchen gebrauchte Insulin („Tetewop") wurde intravenös am Bein appliziert. Es wurde bei allen unseren Versuchen, ausgenommen zwei Versuche, bei denen auch die Zuckerprobe (*Nylander*) gemacht wurde, nur auf das Quantum des ausgeschiedenen Urins geachtet.

Experimenteller Teil.

A. *Akute Versuche*. Die Versuche wurden an zwei Hunden angestellt. Gleichzeitig mit den Beobachtungen auf die Harnausscheidung bei diesen Hunden wurden auch solche auf die äußere Sekretion des Pankreas angestellt [*Collazo* und *Dobreff* (10)]. Bei dem ersten dieser Hunde wurde zweimal Insulin appliziert. Nach der ersten Insulininjektion wurde nur die Pankreassekretion verfolgt. Die erst kurz vor der zweiten Insulin-

injektion (= 9 Kanincheneinheiten) unter Beobachtung gestellte Harnausscheidung blieb nach der Injektion etwa 1 Stunde unverändert. Erst dann stellte sich eine geringe Steigerung der Diurese ein.

Bei dem zweiten Hunde wurden in einem Zeitintervall von etwa 6 Stunden drei Versuche nacheinander angestellt. In den letzten Stunden des Versuchs wurde dem Hunde kein Äther mehr gegeben, weil er sich auch ohnedies in tiefer Narkose befand. Es stellte sich nach der ersten und zweiten Insulininjektion (je 6 Kanincheneinheiten) gar keine Steigerung der Diurese ein (vielleicht ungenügende Insulindosis). Erst etwa 1 Stunde nach der dritten Injektion (10 Kanincheneinheiten) kam es zu einer sehr leichten Erhöhung der Diurese.

Tabelle I. 24. September 1924. Hund 1, ♀, etwa 10 kg. Akuter Versuch. Wirkung der intravenösen *Insulin*injektion auf die normale Urinausscheidung.

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 15 Min.	in je 30 Min.
12h55' — 9 Kan.-Einheiten *Insulin* (in 1 ccm) intravenös (V. femoralis dextra).		
Zwischen 12h55' und 2h00' wurde die Harnausscheidung nicht beobachtet.		
2h00'—2h15'	0,6	1,3
2 15—2 30	0,7	
2h30' — 9 Kan.-Einheiten *Insulin* (in 1 ccm) intravenös (V. femoralis dextra).		

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 15 Min.	in je 30 Min.
2h30'—2h45'	0,6	1,1
2 45—3 00	0,5	
3 00—3 15	0,8	1,3
3 15—3 30	0,5	
3 30—3 45	2,4	5,2
3 45—4 00	2,8	
4 00—4 15	1,4	2,2
4 15—4 30	0,8	
4 30—4 45	1,3	1,8
4 45—5 00	0,5	
5 00—5 15	1,7	2,7
5 15—5 30	1,0	

Tabelle II. 1. Oktober 1924. Hund 2, ♀, etwa 11 kg. Akuter Versuch. Wirkung der intravenösen *Insulin*injektion auf die normale Urinausscheidung.

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 5 Min.	in je 15 Min.
1h15'—1h20'	1,0	
1 20—1 25	1,0	2,9
1 25—1 30	0,9	
1h30' — 6 Kan.-Einheiten *Insulin* (in 1 ccm dest. Wassers) intravenös (V. femoralis dextra).		
1h30'—1h35'	0,4	
1 35—1 40	0,5	1,1
1 40—1 45	0,2	
1 45—1 50	0,3	
1 50—1 55	0,2	1,1
1 55—2 00	0,6	
2 00—2 05	0,5	
2 05—2 10	0,7	1,8
2 10—2 15	0,6	
2 15—2 20	0,3	
2 20—2 25	0,3	0,9
2 25—2 30	0,3	

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 5 Min.	in je 15 Min.
2h30' — 6 Kan.-Einheiten *Insulin* (in 1 ccm dest. Wassers) intravenös (V. femoralis dextra).		
2h30'—2h35'	0,1	
2 35—2 40	0,4	0,7
2 40—2 45	0,2	
2 45—2 50	0,8	
2 50—2 55	0,2	1,1
2 55—3 00	0,1	
3 00—3 05	0,2	
3 05—3 10	0,3	0,5
3 10—3 15	0,0	
3 15—3 20	0,6	
3 20—3 25	0,0	0,6
3 25—3 30	0,0	
3 30—3 35	0,3	
3 35—3 40	0,2	0,6
3 40—3 45	0,1	

Tabelle II (Fortsetzung).

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 5 Min.	in je 15 Min.		in je 5 Min.	in je 15 Min.
$3^{h}45'$—$3^{h}50'$	0,5		$5^{h}05'$—$5^{h}10'$	0,4	
3 50—3 55	0,3	1,1	5 10—5 15	0,3	1,1
3 55—4 00	0,3		5 15—5 20	0,4	
4 00—4 05	0,3		5 20—5 25	0,5	
4 05—4 10	0,3	0,9	5 25—5 30	0,2	1,3
4 10—4 15	0,3		5 30—5 35	0,6	
4 15—4 20	0,4		5 35—5 40	0,3	
4 20—4 25	0,4	1,1	5 40—5 45	0,2	1,2
4 25—4 30	0,3		5 45—5 50	0,7	
4 30—4 35	0,3		5 50—5 55	0,8	
4 35—4 40	0,3	1,0	5 55—6 00	0,6	2,0
4 40—4 45	0,4		6 00—6 05	0,6	
4 45—4 50	0,3		6 05—6 10	0,7	
			6 10—6 15	0,7	2,3
$4^{h}50'$ — 10 Kan.-Einheiten *Insulin* (in 5 ccm dest. Wassers) intravenös (V. femoralis dextra).			6 15—6 20	0,9	
			6 20—6 25	0,5	
			6 25—6 30	0,8	2,1
			6 30—6 35	0,8	
4 50—4 55	0,3		6 35—6 40	0,6	
4 55—5 00	0,4	1,0	6 40—6 45	0,8	2,2
5 00—5 05	0,3		6 45—6 50	0,8	

B. *Chronische Versuche.* Auch hier wurden an zwei Hunden Versuche angestellt. An dem ersten von diesen beiden Harnblasenfistelhunden wurden zwei Versuche angestellt. Es wurden bei diesen Versuchen die nach der intravenösen Insulininjektion in 15-Minutenintervallen registrierte Urinausscheidung mit der bei normalen Verhältnissen vor der Injektion ausgeschiedenen Urinmenge verglichen. Außer der Registrierung der Urinmenge wurde bei diesen zwei Versuchen auch die qualitative Zuckerbestimmung bei jeder 15-Minutenprobe gemacht. Bei diesen Versuchen wurden je 20 neue Einheiten („Tetewop") Insulin injiziert. Zwischen dem ersten und zweiten Versuch war eine Pause von zwei Tagen, in denen mit dem Hund keine Versuche angestellt wurden; so wurde eine gelegentliche Nachwirkung des Insulins ausgeschaltet Der Versuchshund war vor, während und nach dem Versuch ganz gesund.

Tabelle III.

15. Dezember 1924. Harnblasenfistelhund 1, ♀, etwa 13 kg. Verhalten der normalen Urinausscheidung nach Applizierung von *Insulin.*

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zuckerprobe	Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zuckerprobe
	in je 15 Min.	in je 30 Min.			in je 15 Min.	in je 30 Min.	
$10^{h}30'$—$10^{h}45'$	2,6		—	$11^{h}15'$—$11^{h}30'$	0,6	5,4	—
10 45—11 00	4,8	7,5	—	11 30—11 45	4,8		—
11 00—11 15	2,7		—	11 45—12 00	1,8	4,2	—
$11^{h}15'$ — 1 ccm Insulin „Tetewop" (= 20 neue Einh.) intravenös am Bein.				12 00—12 15	2,4		—
				12 15—12 30	4,6	8,3	—
				12 30—12 45	3,7		—

Tabelle III (Fortsetzung).

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zuckerprobe	Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zuckerprobe
	in je 15 Min.	in je 30 Min.			in je 15 Min.	in je 30 Min.	
12h45′— 1h00′	4,4	10,9	—	2h15′— 2h30′	29,0	45,4	—
1 00 — 1 15	6,5		—	2 30 — 2 45	16,4		—
1 15 — 1 30	3,6	12,9	—	2 45 — 3 00	6,2	9,7	—
1 30 — 1 45	9,3		—	3 00 — 3 15	3,5		—
1 45 — 2 00	19,4	46,2	—	3 15 — 3 30	2,9	6,3	—
2 00 — 2 15	26,8		—	3 30 — 3 45	3,4		—

Tabelle IV.

18. Dezember 1924. Harnblasenfistelhund 1, ♀, etwa 13 kg. Verhalten der normalen Urinausscheidung nach Applizierung von *Insulin*.

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zuckerprobe	Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zuckerprobe
	in je 15 Min.	in je 30 Min.			in je 15 Min.	in je 30 Min.	
10h45′— 11h00′	4,4		—	12h30′—12h45′	4,8	9,1	—
11 00 — 11 15	6,0	11,0	—	2 45 — 1 00	4,3		—
11 15 — 11 30	5,0		—	1 00 — 1 15	4,9	14,7	—
11 30 — 11 45	7,9	16,5	—	1 15 — 1 30	9,8		—
11 45 — 12 00	8,6		—	1 30 — 1 45	10,9	22,5	—
12h00′ — 1 ccm Insulin „Tetewop“ (= 20 neue Einh.) intravenös am Bein.				1 45 — 2 00	11,6		—
				2 00 — 2 15	32,5	63,9	—
				2 15 — 2 30	31,4		—
12h00′— 12h15′	4,7	8,9	—	2 30 — 2 45	18,8	30,9	—
12 15 — 12 30	4,2		—	2 45 — 3 00	12,1		—
				3 00 — 3 15	8,7		—

Nachdem bei diesen Versuchen etwa 2 Stunden nach der Insulininjektion keine Veränderung der Harnausscheidung eingetreten war, stellte sich ein plötzlicher Anstieg derselben ein (s. Tabelle III und IV). Diese Steigerung der Urinabsonderung dauerte bei den beiden Versuchen 1½ Stunden. Dann ging die Urinausscheidung wieder auf die normale Höhe zurück. Die Urinausscheidung erfuhr im ersten Versuch (Tabelle III) in ihrem Höhepunkt eine Steigerung von etwa 1000 Proz. im Vergleich mit dem durchschnittlichen Wert der vorherigen normalen Harnabsonderung. Bei dem zweiten Versuch erreichte diese Steigerung nur etwa 600 Proz. (Tabelle IV). Die vor und nach der Injektion angestellten Zuckerproben in 15-Minutenperioden erwiesen sich bei beiden Versuchen negativ.

Am zweiten Hunde mit permanenter Harnblasenfistel wurden drei Versuche angestellt. Zwischen dem ersten und zweiten Versuch war eine Pause von 2 Tagen, dagegen war zwischen dem zweiten und dritten Versuch keine Pause. Bei diesen Versuchen wurde nur auf die ausgeschiedenen Urinmengen geachtet.

Tabelle V. **29. August 1925. Harnblasenfistelhund 2, ♀, etwa 10 kg (operiert am 14. August 1925). Verhalten der normalen Urinausscheidung nach Applizierung von *Insulin*.**

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 15 Min.	in je 30 Min.		in je 15 Min.	in je 30 Min.
$12^h45'$—$1^h00'$	2,7	8,9	$2^h15'$—$2^h30'$	1,1	2,3
1 00—1 15	6,2		2 30—2 45	1,2	
1 15—1 30	5,5	9,5	2 45—3 00	1,0	3,0
1 30—1 45	4,0		3 00—3 15	2,0	
$1^h45'$ — 0,5 ccm Insulin „Tetewop“ (= 10 neue Einheiten) intravenös am linken Bein.			3 15—3 30	2,0	3,5
			3 30—3 45	1,5	
			3 45—4 00	2,5	3,8
			4 00—4 15	1,3	
$1^h45'$—$2^h00'$	1,2	2,9	4 15—4 30	1,0	1,8
2 00—2 15	1,7		4 30—4 45	0,8	
			4 45—5 00	1,2	

Tabelle VI. 2. September 1925. Harnblasenfistelhund 2, ♀ etwa 10 kg. Verhalten der normalen Urinausscheidung nach Applizierung von *Insulin*.

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 15 Min.	in je 30 Min.		in je 15 Min.	in je 30 Min.
$12^h30'$—$12^h45'$	8,4	15,6	$2^h30'$—$2^h45'$	3,9	6,6
12 45— 1 00	7,2		2 45—3 00	2,7	
1 00— 1 15	3,5	8,4	3 00—3 15	3,0	6,4
1 15— 1 30	4,9		3 15—3 30	3,4	
$1^h30'$ — 1,0 ccm Insulin „Tetewop“ (= 20 neue Einheiten) intravenös am linken Bein.			3 30—3 45	4,8	15,9
			3 45—4 00	11,1	
			4 00—4 15	21,2	38,5
			4 15—4 30	17,3	
$1^h30'$— $1^h45'$	2,0	3,9	4 30—4 45	9,0	13,2
1 45— 2 00	1,9		4 45—5 00	4,2	
2 00— 2 15	2,1	5,0	5 00—5 15	3,3	
2 15— 2 30	2,9				

Tabelle VII. 3. September 1925. Harnblasenfistelhund 2, ♀ etwa 10 kg. Verhalten der normalen Urinausscheidung nach Applizierung von *Insulin*.

Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm		Zeit	Ausgeschiedene Urinmenge in ccm	
	in je 15 Min.	in je 30 Min.		in je 15 Min.	in je 30 Min.
$1^h45'$—$2^h00'$	8,5	19,0	$4^h15'$—$4^h30'$	1,8	3,8
2 00—2 15	10,5		4 30—4 45	2,0	
2 15—2 30	7,0	10,2	4 45—5 00	4,0	7,8
2 30—2 45	3,2		5 00—5 15	3,8	
$2^h45'$ — 1,0 ccm Insulin „Tetewop“ (= 20 neue Einheiten) intravenös am linken Bein.			5 15—5 30	4,0	14,1
			5 30—5 45	10,1	
			5 45—6 00	8,5	14,8
			6 00—6 15	6,3	
$2^h45'$—$3^h00'$	1,3	2,5	6 15—6 30	4,5	7,5
3 00—3 15	1,2		6 30—6 45	3,0	
3 15—3 30	1,5	2,7	6 45—7 00	0,5	2,4
3 30—3 45	1,2		7 00—7 15	1,9	
3 45—4 00	1,0	1,8			
4 00—4 15	0,8				

Bei dem ersten Versuch wurden nur 10 neue Einheiten Insulin („Tetewop") appliziert (s. Tabelle V). Hier kam es zu keiner Veränderung der Urinausscheidung (ungenügende Insulindosis!). Erst bei dem zweiten Versuch (20 neue Einheiten Insulin „Tetewop") stellte sich die vorübergehende Steigerung der Urinausscheidung ein (s. Tabelle VI). Nur bei dem dritten Versuch, bei dem auch 20 neue Einheiten Insulin („Tetewop") appliziert wurden, war die oben beobachtete Steigerung der Harnabsonderung nicht ganz so stark ausgesprochen (s. Tabelle VII).

Zusammenfassung.

Bei unseren akuten Versuchen stellte sich nach der intravenösen Insulinapplizierung eine fakultative Steigerung der Harnabsonderung ein.

Bei Hunden mit permanenter Harnblasenfistel kam es nach genügender Dosierung von Insulin (intravenös) zu einer vorübergehenden starken Erhöhung der Harnabsonderung.

Literatur.

1) *Collazo* und *Dobreff*, Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 48, S. 1678 — 2) *Gigon* und *Staub*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 2, S. 1670. — 3) *Pollak* ebendaselbst 1924, Nr. 2, S. 1247. — 4) *Vollmer* und *Serebrinski*, diese Zeitschr. 158, 1925. — 5) *Klissiuins*, ebendaselbst 160, 1925. — 6) *Collazo* und *Händel*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 51. — 7) *Drabkin*, *Pagen Edwards*, Proc. Soc. exper. Biol a. Med. 21, 309, 1924. — 8) *Dobreff*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. 46, H. 1/2, 1925. — 9) *Derselbe*, Experimenteller Beitrag über den Einfluß von Affekten und Muskelarbeit auf die Urinausscheidung (im Druck). — 10) *Collazo* und *Dobreff*, diese Zeitschr. 165, 352, 1925.

Zur Frage der Fraktionierung der Serumproteine.

I. Mitteilung:

Die Elektrodialyse.

Von

G. Ettisch und **W. Beck.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 4. März 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Gewinnung der Proteine des Blutserums geschah im wesentlichen früher durch stufenweises Ausfällen mit Hilfe von gewissen Salzen. Im Jahre 1903 wurde die Elektrodialyse (abgekürzt: E. D.) durch *H. W. Morse* und *G. W. Pierce*[1]) eingeführt und dann namentlich von *Ch. Dhéré*[2]) und *Pauli* im besonderen auf die Anwendung bei der Darstellung der Serumproteine durchgearbeitet.

Zu Anfang erfolgte die E. D. zwischen zwei Pergamentmembranen, und dieses Verfahren ist auch gegenwärtig noch bei manchen Forschern im Gebrauch, wobei durch geeignete Abänderungen der eine oder andere zutage tretende Übelstand überwunden oder umgangen wird. An die Ergebnisse von *Bethe* und *Toropoff*[3]) anknüpfend, haben dann *Ruppel* und Mitarbeiter[4]) eine etwas weiter abweichende Membrankombination angegeben, die sich in praktischer Beziehung großer Wertschätzung erfreut, da mit ihr nach den — in der Tat zutreffenden — Angaben *Ruppels* ein Maximum von Globulinen darstellbar ist.

Bei der starken Unkenntnis, mit der man den Proteinkörpern in vielen Richtungen gegenübersteht, war die Frage nach dem zeitlichen Verlauf und den Bedingungen ihrer Herstellung von besonderer Bedeutung[5]). Nicht nur konnte der ausgefallene Eiweißkörper durch den betreffenden Eingriff an sich aus einem gewissen inneren Zusammenhang gelöst sein und damit nur noch einen Teil eines dereinstigen

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **45**, 606, 1903.

[2]) In Gemeinschaft mit *Gorgolewski*, C. r. **160**, 993, 1910.

[3]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **88**, 686, 1914; **89**, 597, 1915.

[4]) Ber. d. Deutsch. Pharm. Ges. **30**, 314, 1920; sowie Zeitschr. f. Hyg. **97**.

[5]) Diese Arbeit wurde im Auszuge veröffentlicht in der Deutsch. med. Wochenschr., Heft 47, 1925.

Ganzen darstellen, es war auch möglich, daß er, selbst ein Gemisch, den Bruchteil eines etwaigen größeren Gemisches darstellt.

Bei *Ruppel* finden wir auch die ersten Angaben über den Verlauf der E. D. Doch sind seine Angaben zu spärlich, um als Grundlage für eine Vorstellung über den Mechanismus der Fraktionierung dienen zu können. Weiterhin ist als wesentlicher Versuch, den Vorgang der E. D. im weitesten allgemeinen Sinne klarzustellen, die Arbeit von *Freundlich* und *Farmer Loeb*[1]) zu nennen. In den theoretischen Auseinandersetzungen wird auf diese Arbeit noch einmal zurückzukommen sein. Die vorliegenden Untersuchungen setzen sich zur Aufgabe, den Mechanismus der Eiweißfraktionierung besonders mit Hilfe der E. D. aufzuklären.

Wir benutzten bei unseren Untersuchungen jenes oben erwähnte *Ruppel*sche System. In einer Steinzeugzelle werden durch zwei eingefügte Membranen drei Räume abgegrenzt. In den Mittelraum bringt man das Serum, in die beiden Seitenräume die Elektroden. Als Anode diente ein Platinnetz, als Kathode ein solches aus Messing. Nach dieser Seite wurde der Mittelraum von einer Pergamentmembran abgeschlossen, nach der Anodenseite durch eine Wollmembran, auf die eine Chromgelatinemasse verstrichen[2]) und die dann längere Zeit dem Tageslicht ausgesetzt worden war. Die Membran wurde vor dem Gebrauch gründlich ausgewaschen. Die Elektroden befanden sich außerhalb der Mittelzelle. Durch die Elektrodenräume floß dauernd ein Strom destillierten Wassers. In der Mittelzelle betätigte sich dauernd ein elektrisch betriebener Rührer.

Rinderserum wurde 24 Stunden nach der Entnahme des Blutes in einer Verdünnung von einem Drittel (Wasser) in der oben angegebenen Apparatur der E. D. unterworfen, nach dem vorher sein p_H-Wert elektrometrisch (mit der H_2- bzw. Chinhydronelektrode) bestimmt worden war. War diese Apparatur vollständig mit destilliertem Wasser erfüllt, so zeigte ein in den Stromkreis eingeschlossenes Präzisionsinstrument eine Stromstärke von 4 bis 6 mA, bei einer Potentialdifferenz von 120 Volt. Durch einen Regulierwiderstand wurde verhütet, daß beim Beschicken der Mittelzelle mit dem Serum die Stromstärke über 1,5 Amp. stieg. Ohne diesen Widerstand ergab das System — Serum in der Mittelkammer — eine anfängliche Stromstärke von etwa 15 Amp. Die Änderung der Stromstärke wird in demjenigen Bereiche ständig beobachtet, in dem sie ohne jeden zugesetzten Widerstand 1,5 Amp. beträgt. Sodann werden, wie schon erwähnt, die im Vordergrund des Interesses stehenden, ausgefallenen Eiweißmengen bestimmt. Nach der Mikrokjeldahlmethode wurde der Stickstoffgehalt einer jeweilig entnommenen Serumprobe nach Zentrifugieren (10 Minuten bei 3000 Touren in großer Zentrifuge) bestimmt und in bekannter Weise auf Eiweiß umgerechnet. Jede Probe wurde sodann auch der p_H-Bestimmung unterworfen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 522, 1924.

[2]) Diese Masse setzt sich nach *Ruppel* und Mitarbeitern wie folgt zusammen: 10 g Gelatine, 3 g $(NH_4)_2Cr_2O_7$, 5 g Glycerin in 100 ccm destillierten Wassers heiß gelöst und dreimal aufgetragen (zitiert nach *R. Stern*, diese Zeitschr. **144**, 115, 1923).

Die Versuche wurden auf zwei verschiedene Arten angestellt. Das eine Mal wurde die Zelle mit 200 ccm des Serumwassergemisches (ein Drittel Wasser) beschickt. Nach einer bestimmten Zeit wurden die 200 ccm entfernt, zentrifugiert und in der oben angegebenen Weise weiter behandelt. In die Apparatur dagegen wurden wiederum 200 ccm desselben Serums eingefüllt, die nach einer — dieses Mal aber längeren — Zeit der Mittelzelle zur Bestimmung der genannten Zustandsgrößen wieder entnommen wurden, usf. Bei der anderen Versuchsart dagegen wurde den 200 ccm Serum nach bestimmter Zeit eine Serumprobe (10 ccm) zu den oben erwähnten Bestimmungen entnommen, während gleichzeitig der Mittelzelle die entsprechende Menge gleichartigen Serums von der Ausgangszusammensetzung in dem gleichen Serum hinzugefügt wurde. Ein vollständiges Protokoll von Versuchen der ersten Art stellt Tabelle I dar. Sie ist nach den oben gegebenen Erläuterungen ohne weiteres verständlich.

Tabelle I.

Nr. der Probe	Stromstärke mA	Zeit	N-Gehalt in 0,1 ccm Lösung	Eiweiß Proz.	p_H	Bemerkungen
1	15 000	—	0,704	4,4	7,5	Rinderserum, $^1/_3$ verdünnt
2	500	25′	0,658	4,11	10,57	klar
3	300	35	616	3,85	9,63	„
4	100	1h 5	602	3,76	9,96	„
5	90	1 40	574	3,59	9,84	„
6	80	1 45	504	3,15	10,07	leichte Trübung
7	70	2 20	518	3,24	9,99	„ „
8	65	2 30	518	3,24	10,07	„ „
9	55	3	308	1,93	6,54	starke „
10	15	3 50	308	1,93	5,51	
11	14	4	308	1,93	5,43	

Die hier verwandte Chromgelatinemembran war vorher fast ungebraucht. Die Stromstärke zu Beginn der E. D. betrug ∽ 4,0 Amp. Der Versuch von Nr. 1 ist einige Zeit nach Beginn ausgeführt.

Die Dauer der E. D. betrug also insgesamt etwa 25 Stunden. Der Extremwert der Stromstärke von 14 mA war nicht mehr zu unterschreiten aus Gründen, die in den theoretischen Erörterungen klargelegt werden sollen.

Es ergibt sich aus dieser Versuchsreihe, die an *einem und demselben* Serum vorgenommen worden war, folgendes Bild über den Verlauf der Fraktionierung.

Betrachtet man den Gang der Leitfähigkeitsänderung mit der Zeit, so bemerkt man: 1. daß im Verlauf des Stromdurchgangs zu gleich großen Herabsetzungen der Stromstärke immer größere Zeiten benötigt werden, daß sich also der Elektrolytentfernung immer größere Widerstände entgegensetzen;

2. daß im Beginn der E. D. zunächst die p_H-Werte beträchtlich ansteigen, bis zu einem Maximalwert, der weit im Alkalischen liegt;

3. bei relativ niedriger Leitfähigkeit des Systems tritt ein Reaktionsumschwung ein, die p_H-Werte sinken;

4. daß in dem Maße, als durch Elektrolytentfernung die Stromstärke sinkt, fast kontinuierlich Proteinmengen ausfallen. Dies hört auf, sobald die Fällung durch den Reaktionsumschwung erheblich geworden ist;

5. daß dieser Ausfall eintritt, selbst noch in dem Gebiet, wo die p_H zunimmt. (Die Gründe für diese Zunahme der p_H werden im theoretischen Teile auseinandergesetzt werden. Versuche ergaben, daß sich bei einer über die angegebenen Zahlen hinausgehenden Steigerung der p_H der Niederschlag vollkommen wieder löste.)

6. Dort, wo — ohne besonders rapiden Abfall der Stromstärke — die p_H kleiner als 7,0 wird (der isoelektrische Punkt des Globulins liegt bei etwa 6,5), erfolgt ein starker Eiweißausfall, der nahezu 50 Proz. des Gesamtausfalls, der erreicht werden kann, ausmacht.

7. Unter weiterer Verminderung der p_H (bis ∽ 5,4) und weiterem, wenn auch geringem Elektrolytentzug erfolgt kein weiterer, nennenswerter Eiweißausfall.

Von der zweiten Versuchsart gibt Tabelle II ein Protokoll. Hier wurde ein neues Diaphragma in Benutzung genommen.

Tabelle II.

Nr.	Stromstärke mA	Zeit	N-Gehalt in 0,1 ccm Lösung	Eiweiß Proz.	p_H	Bemerkungen
12	—	—	0,640	4,0	7,5	
13	500	35′	598	3,74	10,41	leichte Trübung
14	300	10	602	3,76	10,31	" "
15	90	1h25	598	3,74	10,58	" "
16	80	15	574	3,59	10,40	" "
17	66	15	532	3,33	10,40	" "
18	60	10	532	3,33	10,4	" "
19	50	20	504	3,15	10,59	" "
20	40	25	504	3,15	10,35	" "
21	30	1 45	294	1,91	5,69	starke "
22	20	1 35	290	1,80	5,55	
23	15	2	290	1,80	5,43	

Ein ganz neues anodisches Diaphragma kam in Benutzung. Versuchsdauer 14 Stunden.

Es zeigt sich hier das gleiche Gesamtbild wie bei der für die andere Versuchsart charakteristischen Tabelle I. Desgleichen in den Tabellen III bis V.

Tabelle III.

Nr.	Stromstärke mA	Zeit	N-Gehalt in 0,1 ccm Lösung	Eiweiß Proz.	p_H	Bemerkungen
24	—	—	0,672	4,2	7,4	
25	500	35′	616	3,85	9,68	leichte Trübung
26	200	20	532	3,33	10,47	„ „
27	90	1h 5	504	3,15	10,74	„ „
28	80	15	518	3,24	10,54	„ „
29	70	15	504	3,15	10,4	„ „
30	60	20	448	2,8	10,85	„ „
31	52	40	448	2,8	10,94	„ „
32	40	45	252	1,58	6,69	starke „
33	30	2 25	252	1,58	6,62	
34	15	50	252	1,58	6,47	

Diaphragma von Tabelle II.

Tabelle IV.

Nr.	Stromstärke mA	Zeit	N-Gehalt in 0,1 ccm Lösung	Eiweiß Proz.	p_H	Bemerkungen
35	—	—	0,608	3,8	7,3	
36	500	30′	560	3,4	9,92	leichte Trübung
37	200	35	546	3,41	9,96	„ „
38	82	15	434	2,71	7,36	starke „
39	70	5	448	2,80	5,75	
40	60	5	434	2,71	5,77	
41	50	5	475	2,78	5,87	
42	40	15	434	2,71	5,44	
43	34	50	350	2,19	5,37	
44	20	1h	308	1,93	5,37	

Diaphragma 14 Tage alt, gebraucht.

Tabelle V.

Nr.	Stromstärke mA	Zeit	N-Gehalt in 0,1 ccm Lösung	Eiweiß Proz.	p_H	Bemerkungen
45	—	—	0,560	3,5	7,6	
46	500	35′	420	2,63	9,95	leichte Trübung
47	200	40	434	2,71	10,1	
48	90	1h	392	2,75	9,95	
49	80	15	364	2,28	6,67	
50	68	10	350	2,19	6,67	starke Trübung
51	60	10	350	2,19	5,75	
52	50	5	350	2,19	5,47	
53	40	10	350	2,19	5,30	
54	30	15	308	1,93	5,40	
55	15	30	308	1,93	5,30	

Älteres, benutztes Diaphragma.

Der Vergleich der Protokolle läßt erkennen, daß die p_H-Steigerung zu Beginn der E. D. bei Benutzung einer neuen Membran einen Maximalwert aufweist, der in dem Maße absinkt, als die Membran gebraucht wird[1]). Es wird sich zeigen, daß der Hauptanteil an der Erhöhung der p_H-Werte von einem Einfluß der Chromgelatinemembran herrührt. Es zeigt sich ferner, daß die Leitfähigkeit des Systems stets zu fast dem gleichen Grenzwert (etwa 15 mA) gelangt, und daß, unter Berücksichtigung des jeweiligen Gesamtgehalts des Ausgangsserums, an Proteinen (sowie des möglichen geringen Fehlers durch andere N-haltige Bestandteile), sowie schließlich der individuellen Eigenschaften jedes Serums, doch im allgemeinen ein ziemlich konstanter Bruchteil der Gesamtproteine ausfällt. Schließlich sei noch angemerkt, daß — ebenfalls unter Beachtung aller oben erwähnten einschränkenden Momente — die Säuerung in der Mittelzelle ziemlich übereinstimmend überall an demselben Punkte zu einem gewissen Stillstand kommt.

Es muß aber besonders betont werden, daß keineswegs einer bestimmten Leitfähigkeit jedesmal derselbe Zustand der Mittelflüssigkeit hinsichtlich ihrer H˙-Ionenkonzentration und hinsichtlich der ausgefallenen Proteinmenge entspricht. Die drei Größen können vielmehr, wie die Tabelle VI zeigt, merklich unabhängig voneinander sein.

Tabelle VI.

Nr.	Stromstärke mA	Eiweißausfall	Gesamtgehalt des Serums an Eiweiß	p_H
9	55	2,47	4,4	6,54
19	50	0,85	4,0	10,59
31	52	1,4	4,2	10,94
41	50	1,02	3,8	5,87
51	60	1,31	3,5	5,75
52	50	1,31	3,5	5,47

Man darf also bei der Herstellung von Euglobulin durch die E. D. nicht erwarten, daß übereinstimmende Leitfähigkeiten durchaus übereinstimmende Globulinmengen liefern müssen, vielleicht auch nicht einmal ein Globulin von der gleichen Zusammensetzung. Daß man diesen Umstand nicht genügend beachtet hat, erklärt vielleicht manche Abweichung in den Ergebnissen der Forschungen verschiedener Autoren, sowie auch solche, die im Verlauf *einer* Untersuchung auftraten. Mit

[1]) Es mag Erwähnung finden, daß eine — wenn auch geringe — Fehlerquelle bei den p_H-Bestimmungen in dem Umstande liegen kann, daß dem Serum infolge geringer Hämolyse kleine Mengen eines Oxydations-Reduktionssystems beigefügt sein können. Sobald sichtbare Mengen hiervon vorlagen, wurde das betreffende Serum verworfen.

anderen Worten: Geht man, wie dies öfter geschieht, bis zu einer bestimmten Leitfähigkeit beim Elektrodialysieren herab, unterbricht und verwendet dann die Fraktion, so können leicht Irrtümer zustande kommen, da, wie schon erwähnt, keine Übereinstimmung hinsichtlich der ausgefallenen *Menge* Protein zu bestehen braucht. Es wird aber leicht auch jedesmal ein anderer *Zustand* vorliegen können, da die Reaktion der Mittelflüssigkeit in jedem Einzelfalle jeweils eine andere sein kann. Es läßt sich nun von vornherein über den Zustand des Proteins, das unter so verschiedenen Bedingungen ausgefallen ist, nichts Sicheres behaupten.

Benutzt man aber andererseits den Wasserstoffexponenten als Indikator, so sieht man nach Tabelle VII, daß auch dieser nicht ohne weiteres einen vergleichbaren Maßstab abgibt.

Tabelle VII.

Nr.	p_H	Eiweißausfall	Gesamtgehalt des Serums an Eiweiß	Stromstärke mA
9	6,54	2,47	4,4	55
21	5,69	2,09	4,0	30
34	6,47	2,62	4,2	15
39	5,75	1,0	3,8	70
50	6,67	1,31	3,5	68

Es zeigen demnach diese Versuche, daß es jedenfalls nicht ganz einfach ist, Proteine unter Verwendung der E. D. einwandfrei und vergleichbar herzustellen. Auf der anderen Seite jedoch sind gewisse Regelmäßigkeiten trotz merklicher Schwankungen in den Einzelheiten unverkennbar vorhanden. Es lohnt sich, diesen nachzugehen und zu versuchen, sie zu deuten, was im später folgenden theoretischen Teile dieser Untersuchung geschehen soll.

Vorher schien es zur weiteren Aufklärung der vorliegenden Verhältnisse wichtig, einige Versuche mit *einfacher Dialyse* vorzunehmen und sie in ähnlicher Weise zu verfolgen. Hierbei wurde das Serum so wie bei allen bisherigen Versuchen verdünnt. Bei der Feststellung der jeweiligen Zustandsgrößen wurde so verfahren, wie es oben als zweite Versuchsart beschrieben war. Zwei- bzw. dreimal täglich wurde das Außenwasser gewechselt, während das Serum in Schleicher-Schüllhülsen aus Pergament verblieb. Neben der Anzahl der entnommenen Proben wurde die entsprechende Dauer der Dialyse angemerkt, dann wurde der Gehalt der Probe an Cl'-Ionen qualitativ bestimmt, um die Entfernung der Elektrolyte zu verfolgen, ferner die Eiweißkonzentration und die korrespondierenden p_H-Werte. Zum Vergleich hiermit wurde

dieselbe Menge gleichen Serums sich selbst überlassen und auch hier die p_H-Werte von Zeit zu Zeit bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen VIII und IX.

Tabelle VIII.

Nr.	Dauer in Stunden	Reaktion auf Cl'	Eiweißkonzentration	p_H	p_H des undialysierten Serums	Bemerkungen
1	5	++	6,0	7,4	7,4	klar
2	20	++	—	8,0	—	„
3	25	+	—	8,0	—	trübe
4	28	+	—	7,33	7,6	„
5	44	+	—	7,16	—	„
6	49	+	—	7,06	—	starker
7	55	+	4,9	6,95	7,75	Bodensatz

2mal täglich Außenwasser gewechselt.

Tabelle IX.

Nr.	Dauer in Stunden	Reaktion auf Cl'	Eiweißkonzentration	p_H	p_H des undialysierten Serums	Bemerkungen
8	12	++	6,4	7,5	7,4	klar
9	36	++	—	7,9	—	
10	42	+	—	7,7	—	trübe
11	63	++	—	7,6	7,6	„
12	83	++	—	7,33	—	„
13	94	+	—	7,0	7,7	„ Flocken
14	118	++	—	6,8	—	starker
15	126	+	—	6,7	—	Bodensatz
16	145	+	3,76	6,65	7,8	

3mal täglich Außenwasser gewechselt.

Man bemerkt, daß ganz entsprechend wie bei der E. D. dort, wo ein eben merklicher Elektrolytentzug feststellbar ist (Nr. 4 und 10), auch ein gerade merkbarer Ausfall an Protein auftritt, ferner, daß sich auch bei der Dialyse eine unverkennbare Säuerung einstellt, mit der ein relativ starker Ausfall an Globulin verbunden ist. Die Kontrollversuche an einem Serum, das nicht der Dialyse unterworfen wurde, zeigen dementgegengesetzt den wohlbekannten leichten Gang nach der alkalischen Seite, der auf einer CO_2-Abgabe beruht.

Zusammenfassung.

Über den Verlauf der elektrodialytischen Eiweißfraktionierung läßt sich somit folgendes zusammenfassend aussagen. Sieht man von Abweichungen in Einzelheiten — die im theoretischen Teile der Arbeit

ihre Erklärung finden werden — ab, so besteht die *erste Etappe* bei der Fraktionierung darin, daß allmählich ein Elektrolytentzug stattfindet — gemessen an der Verringerung des Stromtransports im Gesamtsystem —, dem ein kontinuierlicher Ausfall von Proteinen entspricht. Bis zu einem gewissen Punkte zeigt eine Kurve, in der die Stromstärke als Abszisse, der Eiweißgehalt des Serums als Ordinate aufgetragen ist (s. Abb. 1, ausgezogen), einen monotonen Verlauf, d. h. die Ordinatenänderungen gehen proportional denen der Abszissen.

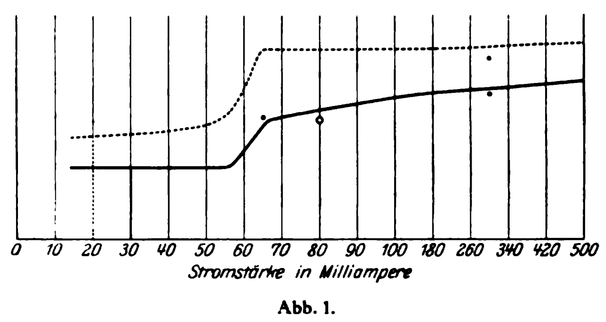


Abb. 1.

········ p_H-Werte. ——— Eiweißgehalt des Dialysats.

An einem Punkte jedoch erfolgt ein plötzlicher steiler Abfall der Ordinaten bei noch gleichbleibender Abszissenänderung. Hier, in der *zweiten Etappe*, findet demnach ein rapider Eiweißausfall statt, bei nur geringer Verminderung des Elektrolytgehalts. Zeichnet man *über dieselben Abszissen wie oben* die p_H-Werte als Ordinaten auf, so ist der Kurvenverlauf im Bereich der ersten Etappe wiederum ein monotoner[1]). Im Bereich der zweiten Etappe dagegen erfolgt fast genau symbat mit der ausgezogenen Kurve bei der nunmehrigen, gestrichelt gezeichneten Kurve ein p_H-Sturz unter 7,0. Mit dieser Änderung der Reaktion ist der Ausfall weiterer Globulinmengen verbunden (etwa 50 Proz. der

---

[1]) Es braucht wohl kaum besonders hervorgehoben zu werden, daß der als „monoton" bezeichnete Verlauf der Stromstärke-p_H-Kurve im ersten Stadium der E. D. — wie ihn Abb. 1 und 2 zeigt — nur im Bereich von Stromstärken gilt, die kleiner als ∽ 500 mA sind. Erst von diesem Werte ab wurden die Kurven gezeichnet. Hätte man den ganzen Verlauf einer E. D. von Beginn an — aufgenommen, so hätte man vor dem monotonen Abfall einen Anstieg bis zu einem Extremwert erhalten. Denn die p_H-Werte zeigen nach den Tabellen ja ein — im Alkalischen gelegenes — Extremum, und auch die Stromstärke steigt — siehe Tabelle I — von ihrem Ausgangswert zunächst stark an. Aus Raumgründen und auch weil nicht von Bedeutung, unterblieb die Zeichnung einer Kurve, die von 4 Amp. über etwa 20 Amp. bis zu 15 mA geführt hätte.

Gesamtausbeute). Es zeigt sich aber (s. Abb. 2 gegenüber Abb. 1), daß p_H-Sturz und Eiweißausfall keineswegs stets bei gleichem Werte der Leitfähigkeit stattfinden, vielmehr kann dieses in ziemlich weitem Bereich (der Leitfähigkeit) schwanken, wie auch Tabelle VI und VII darlegen. In einem besonders extremen Falle, nach überaus langer Benutzung der Chromgelatinemembran, trat der p_H-Sturz bereits bei einem Leitfähigkeitswert von 4,0 Amp. auf.

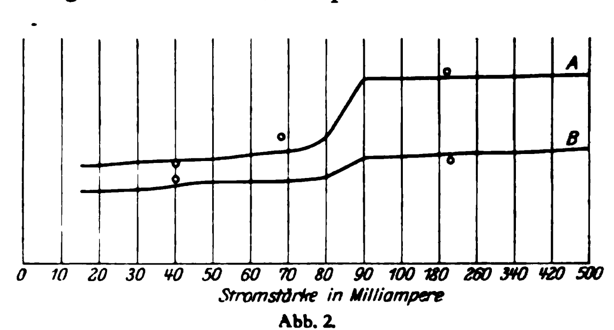


Abb. 2.
A p_H-Werte. *B* Eiweißgehalt des Dialysats.

Auf diese (zweite) Etappe folgt eine *dritte*, bei der Stromstärkeänderung, p_H-Änderung und damit Änderung der Eiweißkonzentration in der Mittelflüssigkeit praktisch verschwindend sind. Bei einer bestimmten Stromstärke, einem bestimmten p_H-Wert und nahezu überall übereinstimmenden Eiweißkonzentrationen kommt der Fraktionierungsprozeß zum Stillstand (die Gründe hierfür werden im theoretischen Teile dargelegt werden).

Aus sekundären Ursachen kann es zu einer Verschiebung der einzelnen Etappen gegeneinander kommen, stets aber bleibt der *typische* Verlauf erhalten. Abb. 1 und 2 zeigen solche elektrodialytischen Ver-

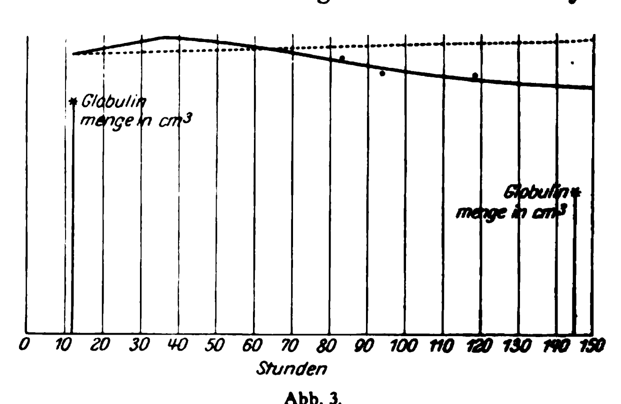


Abb. 3.
······ Das unbeeinflußte Kontrollserum. ——— Dialysiertes Serum.

suche in kurvenmäßigem Bilde. Die Bedeutung der einzelnen Größen ist bereits oben im Texte mitgeteilt.

Die einfache Dialyse zeigt einen Verlauf, der grundsätzlich dem der Elektrodialyse entspricht. In Abb. 3 gibt die ausgezogene Kurve die zeitliche Änderung der p_H-Werte im dialytischen Versuch wieder. Die Änderung im Globulingehalt wird durch Punkte (bzw. deren Ordinaten) am Anfang und am Ende der Dialyse dargestellt. Die punktierte Kurve zeigt die Änderung der p_H-Werte im nicht dialysierten Serum. Man sieht, daß auch bei der einfachen Dialyse, entsprechend dem Elektrolytentzug und der p_H-Änderung, ein starker Eiweißausfall eintritt. Im nicht dialysierten Serum zeigt die p_H-Änderung einen Gang, der gerade entgegengesetzt dem bei der Dialyse festgestellten verläuft.

Zur Frage der Fraktionierung der Serumproteine.

II. Mitteilung:

Zur Theorie der Elektrodialyse.

Von

G. Ettisch.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 4. März 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

1. Die bei der Elektrodialyse zu berücksichtigenden Einflüsse.

Der Verlauf der Elektrodialyse (E. D.) im System Chromgelatine–Pergament läßt sich kurz folgendermaßen zusammenfassen. Das native, auf $^1/_3$ verdünnte Serum von einer $p_H \cong 7{,}8$ zeigt zu Beginn des Stromdurchganges eine allmähliche Zunahme der OH'-Konzentration bis auf $p_H \sim 10$ — bei frischer positiver Membran —, die dann wieder langsam absinkt. Dabei beginnt ein kontinuierlicher, langsam fortschreitender Ausfall von Protein, dessen zeitlicher Verlauf, übereinstimmend mit der p_H-Änderung und dem Rückgang des Stromtransports durch das System, ein monotones Verhalten zeigt. Während Leitfähigkeit und $H^{\cdot}$-Konzentration in einer Weise abfallen, die nichts Besonderes aufweist, sieht man, daß beim Übergang der p_H von 7,0 auf etwa 6,5 ein starker Eiweißverlust der Lösung eintritt. Aus den Tabellen geht hervor, daß im Augenblick des Unterschreitens des Wertes $p_H = 7{,}0$ noch einmal genau so viel Protein ausfällt als während der Dauer des Elektrolytentzuges. Das sind die beiden ersten Stadien der E. D. Sodann aber, im dritten, kommt der Proteinausfall zum Stillstand. Ebenfalls die Änderung der $H^{\cdot}$-Konzentration und die der Leitfähigkeit.

Dieser Verlauf, der zu einem stationären Zustande führt, läßt von vornherein die Vermutung aufkommen, daß eine *Reihe* von Faktoren am Zustandekommen dieses Ergebnisses beteiligt sein werden. Die nächstliegende Annahme wäre wohl die, daß folgende zwei Faktorengruppen wesentliche Beiträge zur Aufklärung der Erscheinungen werden liefern müssen:

1. solche, die durch das benutzte System (Chromgelatine auf Wollmembran als anodisches, Pergament als kathodisches Diaphragma) bedingt, und

2. solche, die durch die Natur der *Mittelflüssigkeit* gegeben sind.

Es werden zunächst die Einflüsse besprochen, die mit der Natur der Membran zusammenhängen.

Bethe und *Toropoff*[1]) haben in eingehender Weise den Mechanismus der Ionenverschiebung an Membranen bei Stromdurchgang aufgeklärt. Ihre Darlegungen könnten demnach auf unsere Verhältnisse ebenfalls angewandt werden. Abweichungen sind insofern vorhanden, als die Mittel- oder „freie“ Flüssigkeit (im Sinne *Bethes*) keine echte Lösung darstellt, sondern ein lyophiles kolloides System, dessen Verhalten gegen Membranen ein anderes ist als das der Ionen der üblichen gelösten anorganischen Elektrolyte. Dieser Umstand wird bei den Ausführungen zu Punkt 2 ausführlich dargelegt werden. Weiterhin liegt bei unserem System derjenige Spezialfall der *Bethe*schen Darlegungen vor, bei dem die Mittelflüssigkeit nicht neutral reagiert, sondern leicht alkalisch ist.

Eine weitergehende, wenn vielleicht auch keine grundsätzliche Abweichung liegt bei unserem System jedoch in der Verwendung *zweier* Membranen, wobei jede auf der einen Seite an die Mittelflüssigkeit grenzt, auf der anderen Seite an destilliertes Wasser im Elektrodenraum. Auf diesen Unterschied haben bereits *Freundlich* und *F. Loeb*[2]) aufmerksam gemacht, die im Anschluß und in Weiterführung der *Bethe*schen Versuche auf dieser Grundlage die Theorie der E. D. zu entwickeln suchten. Schon oben ist auf diese Arbeit hingewiesen worden, die in ihren experimentellen Ergebnissen dort, wo übereinstimmende oder vergleichbare Anordnung herrscht, von den unseren vollauf bestätigt wird. Im Zusammenhang damit geben die theoretischen Erörterungen dieser Autoren den Versuch der Deutung der allgemeinen Erscheinungen der E. D., vor allem, indem sie die Permeabilitätsverhältnisse der Ionenarten gegenüber den bezüglichen positiven und negativen Membranen eingehend erörtern unter Zugrundelegung der Adsorptionsverhältnisse und der daraus folgenden Bedingungen für die Bewegungsfreiheit der Ionen. Auch in theoretischer Hinsicht stimmen unsere Ergebnisse mit den ihren überein, soweit sie die gleichen Punkte betreffen.

Für die Klärung eben dieser besonderen Verhältnisse ist es erforderlich, wiederum auf jene Arbeiten *Bethes* zurückzukommen. Die *Bethe*sche Theorie erörtert vorzugsweise die Konzentrations- und Wasserverschiebungen zu beiden Seiten der Membranen, sowie die

---

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 88, 686, 1914; 89, 597, 1915.
[2]) Diese Zeitschr. 150, 522, 1924.

eben dort auftretenden Störungen der Gleichverteilung von $H^{\cdot}$ und OH'. Mit Rücksicht auf diesen Punkt ergaben die Untersuchungen an unserem System folgendes. Während der alkalischen Reaktion war die Anodenseite des anodischen Diaphragmas stets sauer, die Kathodenseite alkalisch. An der Pergamentmembran war die Anodenseite sauer, die Kathodenseite alkalisch, solange man alkalisches Medium in der Mittelzelle vorfand. Ging die Reaktion ins saure Gebiet[1]), so fand sich Umkehr dieser Zustände. Diese Verhältnisse folgen nun mit einer Einschränkung aus den hierfür von *Bethe* und *Toropoff* aufgestellten Termen[2]).

Eine erhebliche Komplikation erfahren aber die Verhältnisse infolge der besonderen Natur der Chrom-Gelatinemembran gegenüber den einfachen Bedingungen, wie sie *Bethe* annahm. Die Pergamentmembran ist eine negative Membran im hinreichend strengen Sinne der Vorstellungen über Adsorption. Die mit chromierter Gelatine bestrichene Wollmembran dagegen bietet eine Abweichung insofern, als nicht nur adsorptiv gebundene Mengen von positiv aufladenden Ionen vorhanden sind. Die Membran ist vielmehr überreich mit einem Salze $(NH_4)_2Cr_2O_7$ bestrichen, das die Membran positiv machen soll. Dieser Umstand stellt das komplizierende Moment dar. Bei der Vorbereitung wird die Membran dreimal mit diesem Salze bestrichen und dann längere Zeit der Lichteinwirkung ausgesetzt. Dabei geht ihre Farbe von gelbrot in grün über. Man weiß, daß dabei neben Chromoxyd auch Chromichromate entstehen, die mit der Gelatine unlösliche Verbindungen eingehen, während irgend ein dabei entstehendes NH_4-Salz $[NH_4)_2CrO_4$?] löslich ist. Daher kommt offenbar die Verfärbung, läßt man eine solche Membran längere Zeit in einem Glase mit Wasser stehen. Trotz langdauernden Auswaschens ist die Membran unter dem Einfluß des elektrischen Feldes immer noch imstande, $NH_4^{\cdot}$ abzugeben. Man kann es mit Nesslerreagens sowohl in der Mittelzelle als auch im Kathodenraum kurze Zeit nachdem die E. D. in Gang gesetzt ist nachweisen. Dieser $NH_4^{\cdot}$-Abgabe (in den Anodenraum wandert das entsprechende Anion) unter Einwirkung des Stromes (120 Volt) ist offenbar die steigende Alkalität der Mittelzelle im ersten

[1]) D. h. also mit Bezug auf die Ergebnisse der vorstehenden Arbeit: nach dem Reaktionsumschwung in der Mittelflüssigkeit.

[2]) Diese Einschränkung betrifft die Ladungsverhältnisse an der anodischen Membran bei saurer Reaktion unter Gegenwart von Neutralsalz. Hier sollen nach den *Bethe*schen Herleitungen an der anodischen Fläche positive Ladungen, an der kathodischen negative auftreten, während wir obige Feststellungen machten. Es sei in diesem Zusammenhange nur bemerkt, daß vielleicht die *Bethe*schen Voraussetzungen doch etwas zu einfacher Natur sind, um in diesem so vielfältigen und schwierigen Systeme durchweg auf zutreffende Verhältnisse führen zu können.

Stadium der E. D. zuzuschreiben. Dabei ist leicht feststellbar, daß in der Nähe der kathodischen Fläche der positiven Membran der Alkalitätsgrad etwas höher ist als in der Mitte der Mittelflüssigkeit, während, wie oben schon auseinandergesetzt, die anodische Fläche des kathodischen Diaphragmas stets saure Reaktion zeigt. So wird es verständlich, daß längere Zeit gebrauchte Diaphragmen allmählich weniger $NH_4^{\cdot}$ abgeben, da die Membran ausgelaugt wird. Daher sinkt auch mit der Zahl der Elektrodialysen, die ein solches Diaphragma durchmacht, die Höhe der Erhebung der p_H-Werte über den Ausgangswert des Serums. Schließlich muß im unteren Grenzfalle eine solche Membran ihre besondere Wirksamkeit überhaupt einbüßen.

Es sei nochmals erwähnt, daß die positive Membran nicht sofort nach Fertigstellung zur E. D. benutzt wurde, sondern daß wir sie mehrere Tage unter Wasserwechsel spülten. Da die Spülflüssigkeit dann deutlich grün gefärbt war, konnte man annehmen, daß ein Teil des NH_4-Salzes bereits herausdiffundiert war. Die dann noch in der Membran verbleibenden Mengen waren aber sicherlich weit größer, als dem Adsorptionsgleichgewicht der Wand entspricht. Sie waren daher befähigt, im elektrischen Felde aus der Wand herauszuwandern, da sie höchstwahrscheinlich nur grob kapillar in der Membran gebunden waren.

Die nach der Theorie von *Bethe* und *Toropoff* sich einstellenden Reaktionsverschiebungen an Membranen äußern aber hierbei noch ihren Einfluß in folgender Weise. Solange die Mittelflüssigkeit sauer reagiert, zeigt die anodische Fläche der positiven Membran saure, die kathodische alkalische Reaktion. An der negativen, der Pergamentmembran, herrschen die gleichen Verhältnisse vor (s. Abb. 1). Dieses bedingt aber für beide Membranen, daß sich über das angelegte äußere elektrische Feld noch das aus der Reaktionsverschiebung sich ergebende positiv überlagert. An der Chromgelatinemembran kommt es daher zu einer beschleunigten Herauswanderung von $NH_4^{\cdot}$ in der Mittelflüssigkeit und von entsprechenden Anionen in den Anodenraum. An der negativen Membran wird hierdurch die Abwanderung der $H^{\cdot}$ durch die Membran hindurch beschleunigt. Eine gewisse Beschleunigung sollte auch den OH' zukommen, doch wird diese dadurch wieder aufgehoben, daß die in der Membran reichlich vorhandenen (Chromat-?) Anionen auf die OH' hemmend wirken. Insgesamt wird durch diese Verhältnisse der Anstieg zu alkalischer Reaktion in der Mittelflüssigkeit begünstigt.

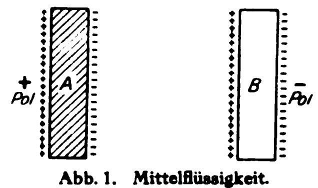


Abb. 1. Mittelflüssigkeit. *A* positive Membran *B* negative Membran.

Tritt nun aber der oben nachgewiesene Reaktionsumschwung ein, so wechseln auch die bezüglichen Flächen der Membranen das Vorzeichen im Ladungssinn (s. Abb. 2). Dieses hat aber zur Folge, daß die Überlagerung jetzt nicht mehr positiv erfolgt, sondern negativ, d. h. das angelegte äußere Feld wird geschwächt. Die $NH_4^{\cdot}$-Auswanderung aus der positiven Membran wird nunmehr gegen früher herabgesetzt. Die Pergamentmembran hemmt jetzt die Abwanderung der $H^{\cdot}$. Auch wird ebenfalls eine Hemmung der OH'-Auswanderung aus der Mittelflüssigkeit erfolgen, jedoch wird diese, den oben ausgeführten Verhältnissen entsprechend, stärker sein als die der $H^{\cdot}$. Die jetzt vorliegenden Zustände begünstigen aber insgesamt ein Absinken der p_H-Werte. Daraus folgt aber, daß eine weitergehende Säuerung der Mittelflüssigkeit, die — wie wir noch sehen werden — unabhängig von diesen Membranverhältnissen infolge *Donnan*scher Membranhydrolyse der Proteinkörper eintreten muß, nur in geringem Maße durch die Hydrolyse infolge $NH_4^{\cdot}$-Einwanderung verstärkt werden kann[1]). Tabelle I zeigt dementsprechend, daß die Extremwerte der alkalischen Reaktion stets weiter vom Ausgangswert des betreffenden Serums abweichen als die sauren am Ende der E. D.

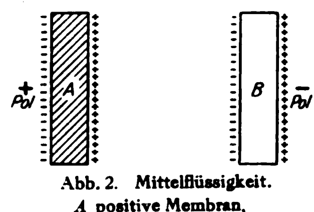


Abb. 2. Mittelflüssigkeit. *A* positive Membran, *B* negative Membran.

Tabelle I.

Lfd. Nr.	p_H^a	p_H^I	p_H^{II}	Δ	Bemerkungen
2	7,5	10,57	—	$\Delta_1 = -3{,}07$	$p_H^a = p_H$-Wert des Ausgangsserums
11	7,5	—	5,43	$\Delta_2 = +2{,}07$	
19	7,5	10,95	—	$\Delta_1 = -3{,}09$	p_H^I = alkal. Extremwert bei der E. D.
23	7,5	—	5,43	$\Delta_2 = +2{,}07$	
31	7,4	10,94	—	$\Delta_1 = -3{,}54$	p_H^{II} = saurer Wert am Ende der E. D.
34	7,4	—	6,47	$\Delta_2 = +0{,}93$	
37	7,3	9,96	—	$\Delta_1 = -2{,}66$	Δ = Differenz
44	7,3	—	5,37	$\Delta_2 = +1{,}93$	
47	7,6	10,1	—	$\Delta_1 = -2{,}50$	
		—	5,3	$\Delta_2 = +2{,}3$	

[1]) Es sei hier kurz folgendes vorweggenommen, was zum vollen Verständnis notwendig ist und weiter unten noch eingehend behandelt werden wird. Die $NH_4^{\cdot}$-Einwanderung ruft eine Hydrolyse in der Mittelflüssigkeit hervor. Bei dieser entstehen im Überschuß $H^{\cdot}$. Diese werden durch Eiweiß + Elektrolyt eine gewisse Zeitlang fortgepuffert. In dem hier vorliegenden Stadium der E. D. ist diese Pufferfähigkeit nicht mehr vorhanden. Die $H^{\cdot}$ bleiben daher frei.

Die zweite Faktorenreihe, die zu berücksichtigen ist, stellt die Mittelflüssigkeit mit ihren Eigenheiten. Zwischen den in der Flüssigkeit enthaltenden Ionen müssen wir Wechselwirkungen annehmen, wie sie bei dem bekannten *Donnan*schen Gleichgewicht maßgebend sind. Denn wir haben sowohl nicht dialysierbare Eiweißionen wie auch anorganische Ionen, die durch die Membranen hindurchgehen können. Daß dieses notwendig ist, geht allein schon aus dem Verhalten des Serums bei der einfachen Dialyse im Pergamentsäckchen hervor. Unter diesen vereinfachten Bedingungen treffen wir bereits auf die Tatsache, daß das Dialysat sauer wird. Man wird sich leicht vorstellen können, daß durch Anlegen eines elektrischen Feldes sowie durch Aufrechterhalten eines möglichst großen Diffusionsgefälles — beides findet sich bei der E. D. — man diesen Effekt noch verstärken kann. Es liegt demnach in beiden Fällen eine Membranhydrolyse im Sinne *Donnans* vor. Diese Erscheinung ist zu gut bekannt, als daß es notwendig wäre, an dieser Stelle ihre Grundgedanken nochmals auseinanderzusetzen. Entsprechend der leicht alkalischen Reaktion des Serums wird, wenn auch in geringem Maße, ein Na-Proteinat vorliegen. Unter der Wirkung des Feldes wandert das $Na^{\cdot}$ in den Kathodenraum, während das Proteinanion durch die Membran nicht hindurch kann. Durch Auswanderung von OH' (an Stelle des nicht durchwandernden Proteinions) kommt es zu einer Hydrolyse („Membranhydrolyse"), dadurch aber steigt die Zahl der $H^{\cdot}$ in der Mittelzelle.

Durch die Untersuchungen von *Hardy*[1]) und auch von *Robertson*[2]) wissen wir, daß bei den Globulinen die Säurendissoziation die Basendissoziation überwiegt.

Zu den Eigenschaften der Mittelflüssigkeit muß noch ihre Fähigkeit der Pufferung hinzugerechnet werden. Diese ist bekanntlich für die $H^{\cdot}$ etwa sechsmal so stark als für die OH' [*Friedenthal*[3])]. Auch ist zu beachten, daß naturgemäß im Laufe der E. D. die Elektrolyte hinauswandern. Außer diesen sind vor allem die Eiweißkörper selbst an der Pufferung beteiligt.

2. Versuch einer Erklärung der zeitlichen Vorgänge bei der E. D.

Aus dem Zusammenwirken der beiden erörterten Hauptfaktorengruppen mit ihren zeitlichen Änderungen muß sich das Gesamtbild des Ablaufs der E. D. ergeben. Dieses ist zunächst nur qualitativ möglich, da man über gewisse Vorgänge in der Membran und auch in der Mittelflüssigkeit zu wenig weiß. Eine weitere Schwierigkeit bietet

1) Journ. of Physiol. **33**, 251, 1905.
2) Journ. of phys. Chem. **11**, 437, 542, 1907.
3) Arch. f. physiol. Verh. d. Physiol. Ges. Berlin, 8. Mai 1903.

fernerhin das Moment des zeitlichen Ineinandergreifens der verschiedenen Vorgänge.

Trotz dieser Schwierigkeiten besteht aber der Eindruck, als könnte man in großen Zügen das Verhalten des Serums bei der E. D. befriedigend erklären und so dann bei ihrem Verlauf die Haupterscheinungen voraus sagen, auch wenn — wie etwa bei anderen Methoden — Einzelfaktoren variiert werden.

Zu Beginn der E. D., im sogenannten *ersten* Stadium, findet eine Einwanderung von $NH_4^{\cdot}$ aus der Membran in die Mittelzelle statt. Hier kommt es zu einer Hydrolyse von der Art

$$2\,NH_4^{\cdot} + 2\,H_2O \rightleftarrows NH_4OH + NH_4^{\cdot} + OH' + 2\,H^{\cdot}. \qquad (a)$$

Infolge der Pufferung durch die Serumelektrolyte sowie die der Eiweißkörper[1]) selber wird eine Reaktionsänderung eine Zeitlang hintangehalten. Da aber die Pufferung für OH' in dem erwähnten Maße schwächer ist als für die $H^{\cdot}$, so wird sich alkalische Reaktion einstellen, d. h. es können die $H^{\cdot}$ noch kompensiert werden, wenn dieses mit den gleichzeitig entstandenen OH' nicht mehr geschieht. Dazu kommt, daß im elektrischen Felde das $H^{\cdot}$ viel rascher wandert als das $NH_4^{\cdot}$ (etwa fünfmal so rasch). Schließlich kommen zu alledem noch die oben ausführlich dargelegten Verhältnisse an den bezüglichen Flächen der beiden Membranen. Alle diese Umstände werden hier, im ersten Stadium der E. D., ein Entstehen alkalischer Reaktion begünstigen[2]).

Läßt nun die Pufferung nach, so beginnt die Dämpfung des alkalischen Extremwertes der Flüssigkeit, da jetzt diejenige Zahl der durch Hydrolyse entstandenen $H^{\cdot}$, die bisher fortgepuffert wurde, in der Lösung frei bleibt. Es sind nun nicht sehr große Mengen an $H^{\cdot}$ nötig, um die p_H-Werte erheblich herabzudrücken. Man befindet sich nämlich beim Maximum der Alkalität in dem Bereich von etwa 10^{-4} mol. Alkalilösung. Da der ψ—c-Kurvengang (ψ = Potentialdifferenz, c = Konzentration) ein exponentieller ist, entsprechend der bekannten Beziehung

$$c = e^{-\frac{RT}{nF}} \qquad (1)$$

---

[1]) Man kann die Beziehung (a) daher auch schreiben:

$$2\,NH_4^{\cdot} + HROH \rightarrow NH_4ROH + H^{\cdot} \qquad (a')$$

$$2\,NH_4ROH + 2\,H_2O \rightarrow NH_4OH + NH_4^{\cdot} + OH' + 2\,HROH \qquad (a'')$$

[2]) Es braucht wohl kaum näher dargelegt zu werden, wie im einzelnen die Pufferung auf Elektrolyt und auf Eiweißkörper sich verteilt. Es ist dieses für unseren Fall auch gleichgültig. Da nur die gesamte Säuren- bzw. Basenkapazität des Serums eine Rolle spielt. Für etwaige Einzelheiten sei auf die Darlegung von *R. Höber*, Physikalische Chemie der Zelle verwiesen, sowie auf die interessanten Arbeiten von *H. Straub* und *Kl. Meier* sowie auch auf *Kl. Gollwitzer-Meier* (diese Zeitschr. **168**, 470, 1925).

(wo die Bezeichnungen alle die hinlänglich bekannten Größen betreffen), oder etwas anders ausgedrückt: da der p_H—c-Kurvengang vom alkalischen ins saure Gebiet ein bilogarithmischer ist, entsprechend der Formel:

$$p_H = -\ln c = \frac{nF}{RT}\psi, \qquad (2)$$

und die Alkalikonzentration von 10^{-4} mol. noch recht nahe dem Nullpunkt der Kurve liegt, wird die Hinzufügung einer relativ geringen Menge $H^{\cdot}$ — als Abszisse aufgetragen — bereits zu einem Kurvenpunkt mit relativ bedeutend kleinerer Ordinate führen (p_H-Wert!), da dieser Konzentrationsbereich im Gebiete starker Ordinatenänderung bei geringer Abszissenänderung liegt. Es ist ja genügend bekannt, daß in der Umgebung des Neutralpunktes sehr geringe Mengen von $H^{\cdot}$ oder OH' hinreichen, um eine Verschiebung der p_H-Werte um zwei bis drei Einheiten zu bewirken. Wird aber auf diese Weise der Alkaliüberschuß herabgedrückt, so verstärkt die jetzt merkbar werdende Membranhydrolyse die Tendenz zur Steigerung der Säuerung. Da die Eiweißkörper des Serums in diesem Bereich bevorzugt als Säuren, nicht aber als Basen wirksam sind, so muß bei der Membranhydrolyse[1]) mit den $Na^{\cdot}$ ein OH' auswandern. Solange OH' im Überschuß frei vorhanden waren, konnte bei diesem Vorgang durch Eintreten eines der OH-Ionen — entweder aus dem Pufferreservoir oder eben dem Überschuß aus der Hydrolyse durch die NH_4-Salze — ausgeglichen werden. Ist aber die Pufferung nicht mehr vorhanden, auch nicht mehr ein erheblicher OH'-Überschuß, so werden die Vorgänge, die zur Membranhydrolyse führen, nicht mehr ausgeglichen. Die eintretende Membranhydrolyse verstärkt ebenfalls die Säuerung. In gleicher Richtung wirken jetzt die Ladungszustände an den bezüglichen Membranflächen. Nach dem Reaktionsumschwung in der Mittelflüssigkeit haben auch sie ihr Vorzeichen gewechselt. Wiederum muß darauf hingewiesen werden, daß gar nicht sehr große Mengen $H^{\cdot}$ erforderlich sind, um die p_H-Werte erheblich zu drücken.

Außer den Veränderungen, die die Konzentration der $H^{\cdot}$ und OH' betreffen, müssen wir jetzt noch die Bedeutung des Elektrolytentzuges für das Verhalten der Eiweißkörper berücksichtigen. Die ursprünglich vorhandenen Elektrolyte peptisierten die Proteine und hielten sie in Lösung. Der mit der E. D. einhergehende Elektrolytentzug aber bedeutet eine *Verminderung* von solchen Substanzen, die die Peptisation des Globulins bewirken. Selbst die anfänglich einsetzende Steigerung

---

[1]) Es handelt sich, richtiger gesagt, um die an den einzelnen Eiweißmolekülen (bzw. -ionen bzw. Wassermolekülen) eintretenden Vorgänge, die allmählich zu einer Membranhydrolyse führen.

der OH′-Konzentration vermag die peptisierende Wirkung der Elektrolyte nicht zu ersetzen. So geht entsprechend der Verminderung an Elektrolyten (sowie naturgemäß auch der OH′-Konzentration) bis zum Neutralpunkt des Wassers eine gewisse Proteinmenge in den Niederschlag.

Wir kommen jetzt zum *zweiten* Stadium der E. D. Auf Grund der geschilderten Vorgänge wird der Neutralpunkt unterschritten, und es fällt dann — etwa im Bereich von $p_H = 7,0$ bis 6,5 — nochmals eine Proteinmenge aus, die von der gleichen Größe ist wie die vorher ausgefallene. Ob diese beiden Proteine hinsichtlich ihrer molekularen Konfiguration übereinstimmen, ob überhaupt im ganzen Laufe der E. D. ein einheitlicher Eiweißkörper oder nicht vielleicht mehrere, voneinander unterschiedene, ausfallen, darüber sind augenblicklich Versuche im Gange. Aus diesen Erfahrungen wird sich ergeben, wie man die Nomenklatur der bezüglichen Serumproteine wird handhaben müssen. (Bisher pflegte man wohl mit *R. Stern*[1]) die „schon durch unvollständige Entfernung der Elektrolyte" ausfallenden Eiweißkörper als „Labilglobuline" zu bezeichnen.) Dieser *zweite* Ausfall wird dadurch verursacht, daß man infolge der Säuerung bei relativer Elektrolytfreiheit den isoelektrischen Punkt des Euglobulins durchschreitet, d. h. den Punkt geringster Stabilität.

Das *dritte* Stadium ist der schließlich eintretende stationäre Zustand. Man kommt auf einen nur noch sehr langsam abnehmenden Leitfähigkeits- und einen ebensolchen p_H-Wert. Die Leitfähigkeit wird nicht so niedrig, wie sie etwa ist, wenn man die Mittelzelle frisch mit destilliertem Wasser gefüllt hat. Im letzten Falle geht ein Strom von 4 bis 6 Milliamp. durch den Apparat, während der schließliche Wert der Stromstärke, den man am Ende einer E. D. erreichen kann, etwa 15 bis 17 Milliamp. beträgt. Es beruht dies darauf, daß doch stets aus der Membran Elektrolyte in die Flüssigkeit gebracht werden. Der oben erwähnte niedrige Wert von 4 bis 6 Milliamp. gilt auch nur für den frisch gefüllten Apparat. Die Stromstärke steigt, wenn man ihn, mit destilliertem Wasser gefüllt, sich selbst überläßt.

Der Grenzwert des p_H ist durch die Wechselwirkung der Membranhydrolyse mit der Abgabe der $NH_4^{\cdot}$ durch die Membran bedingt. Die Membranhydrolyse allein würde bei Einwirkung des elektrischen Stromes zu einem kleineren p_H-Wert (etwa 4,0)[2]) führen. Die Zustände an Membranen jedoch, die oben ausführlich auseinandergesetzt worden waren und die hier noch immer eine Hemmung auf die Geschwindigkeit der OH′ bewirken, verursachen dementsprechend den

---

[1]) Diese Zeitschr. 144, 125, 1924.

[2]) Siehe die oben genannte Arbeit von *Freundlich* und *Loeb*.

höheren Wert von etwa 5,4. Man ersieht die Richtigkeit dieses Schlusses auch aus folgenden Beobachtungen. Ist die Membran lange in Gebrauch, so sinkt der alkalische Extremwert im ersten Stadium der E. D. Daher tritt auch dann nach immer kürzerer Dialysedauer der p_H-Sturz ein. In einem besonders krassen Falle geschah dieses bereits bei >4 Ampere. Es war offenbar nur noch sehr wenig NH_4-Salz in der Membran, die Hemmung der OH'-Auswanderung nur noch äußerst gering.

3. Vergleich der verschiedenen Membrankombinationen.

Außer diesen Haupterscheinungen lassen sich auch gewisse Nebenerscheinungen deuten. Daß die Membran allmählich immer weniger $NH_4^{\cdot}$ abgibt, ist ja plausibel, damit auch der immer geringer werdende alkalische Extremwert im ersten Stadium der E. D., daher auch die Verschiebung des Auftretens der Säuerung nach höheren Leitfähigkeitswerten hin. Die verringerte OH'-Konzentration infolge weniger gehemmter OH'-Auswanderung kann durch die erhöhte Pufferfähigkeit der Mittelflüssigkeit für $H^{\cdot}$ nicht wettgemacht werden. Es erklärt sich aber vor allem auch das relativ schnelle und extrem verlaufende Auftreten der Säuerung, wenn man unter sonst gleichen Bedingungen mit zwei Pergamentmembranen elektrodialysiert. Hier fällt der die Säuerung überkompensierende Anstieg ins Alkalische ganz fort. Die anodische Membran stellt vor allem nicht mehr durch eigenen reichlichen Salzgehalt den durchwandernden Anionen ein Hindernis dar. Zudem kommt zu der relativen Beschleunigung der OH'-Abwanderung auch noch eine absolute Beschleunigung der $Na^{\cdot}$-Wanderung, da sie hier allein im Felde (früher noch $H^{\cdot}$ und $NH_4^{\cdot}$) durch die kathodische Membran wandern. Dieses wirkt aber wieder auf die Geschwindigkeit der Abnahme der OH' in der Mittelflüssigkeit zurück. Zudem ist zu beachten, daß die OH' dreimal so rasch wandern als die $Na^{\cdot}$.

Sobald also infolge Elektrolytentzug usw. keine Pufferung der $H^{\cdot}$ mehr eintritt (die durch die Membranhydrolyse bedingt ist), geht die Reaktion schnell ins saure Gebiet, und zwar bis zu den Extremwerten von 4,0 (*Freundlich* und *F. Loeb*, Protokoll k_2). Diese relativ starke Erniedrigung der p_H-Werte erklärt sich im Anschluß an früher Dargelegtes so, daß infolge Umkehr im Ladungssinn der bezüglichen Grenzflächen der anodischen Membran allerdings auch eine Bremsung der Durchwanderungsgeschwindigkeit der OH' eintritt. Diese Behinderung ist aber keineswegs so stark wie bei der mit Salz beladenen Chromgelatinemembran. Bei diesem p_H-Wert (4,0) erfolgt nun eine völlige Lösung des Eiweißniederschlages, was im übrigen genau den Bedingungen entspricht, die *Ettisch* und *Runge*[1]) für die Löslichkeit von Euglobulin bei relativer Elektrolytfreiheit aufgezeigt hatten.

[1]) Kolloid-Zeitschr. 37, 26, 1925.

Für die Richtigkeit der hier gegebenen Erklärung spricht auch das Verhalten der *Stromstärke* bei Anwendung verschiedener Membrankombinationen. Bei zwei Pergamentmembranen treffen wir nur auf einen unerheblichen Anstieg der Leitfähigkeit. Nach den Versuchen von *Freundlich* und *Loeb* steigt dabei — nach Protokoll a — die Stromstärke von 12 auf 23 Milliamp. Sehr stark ist dagegen der Anstieg, sobald man *zwei* Chromgelatinemembranen verwendet. Protokoll b der genannten Autoren zeigt einen solchen von 12 auf 318 Milliamp., da von beiden Membranen sowohl $NH_4^{\cdot}$ als auch — wahrscheinlich — Chromationen abgegeben werden. Die *Ruppel*sche Kombination: Chromgelatine—Pergament steht somit in dieser Hinsicht etwa in der Mitte.

Benutzt man an Stelle des NH_4-Salzes das entsprechende Kaliumsalz zur Herstellung der Membran, so erreicht durch Einwanderung des $K^{\cdot}$ die Hydrolyse und damit die Alkalitätssteigerung noch höhere Werte. Diese werden so groß, daß trotz Elektrolytentzug kein Eiweiß ausfällt, selbst nachdem die Elektrolyte weitgehend aus der Mittelzelle herausgewandert sind. Es kommt nur sehr schwer und nach sehr langer Zeit zu einer Säuerung. Infolge der völligen Dissoziation des KOH ist die durch sie bedingte OH'-Konzentration größer, und der schließlich am Ende der E. D. erreichte Grenzwert des p_H, wie er durch Wechselwirkung der Membranhydrolyse und der $K^{\cdot}$-Abgabe der Membran zustande kommt, wird höher liegen, möglicherweise noch im Alkalischen. Ist dies letztere aber der Fall, so kommt es *nicht* zu einer Säuerung und daher, wie die Erfahrung gelehrt hat, auch nur zu einem sehr geringen Eiweißausfall.

Eine mehrere Stunden dauernde Alkalität der Mittelflüssigkeit ist äußerst bedenklich. Der Eiweißniederschlag, der dann beim Sauerwerden auftritt, sieht völlig anders aus als der, den man sonst erhält. Die Flocken setzen sich leicht ab. Der Niederschlag kann ohne Zentrifugieren durch Abgießen der Flüssigkeit erhalten werden, er löst sich aber viel schwerer als sonst in Alkali wieder auf. Man trifft auch auf gelbbraune, glasig-gallertig aussehende Klümpchen, die sich überhaupt nicht mehr lösen. Es scheint, als ob sich hier irreversible Kondensationsprodukte gebildet hätten, die in extremen Fällen ganz unlöslich sind. Auch im normalen Dialysat schwimmen manchmal derartige Klümpchen herum und zeigen ganz dieselben Eigenschaften. Mögen hier auch die individuellen Eigenschaften des Serums eine Rolle spielen, so besteht jedenfalls ein unbestreitbarer Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Gebilde und der Alkalität der Mittelflüssigkeit. Dafür spricht auch folgende Erfahrung. Nach unseren Beobachtungen — wie es auch aus der Theorie von *Bethe* und *Toropoff* sich ergibt — tritt für die kathodische Fläche des anodischen Diaphragmas eine

Anhäufung von OH' auf, wodurch die Konzentration dieser Ionen hier größer wird als in der Mitte der Mittelflüssigkeit. Nun beobachtet man, besonders bei ganz neuen Membranen sowie auch bei Präparation der Membran mit $K_2Cr_2O_7$, an der genannten Fläche die Bildung von krustigen schwartenähnlichen, gelbbraunen, sehr elastischen Massen. Man beobachtet weiter oft, daß die durch E. D. hergestellten Proteine sich in Normosal in bestimmten Mengen gut lösen, ein anderes Mal aber weniger gut. Das beruht vielleicht eben wieder darauf, daß manche Seren durch das Verweilen im alkalischen Medium eine, wenn auch naturgemäß nur leichte Änderung im Sinne einer Kondensation erfahren, infolge deren wiederum ihre Löslichkeit verändert wird. Man muß wohl mit einer Veränderung in der Struktur des Moleküls selbst rechnen. Es zeigt sich damit, daß das Verweilen in alkalischen Medien sorgsam überwacht werden muß; denn zwischen der schwartenähnlichen, starken Veränderung des Proteins und einer leichten Veränderung bei geringer Einwirkungsmenge und -zeit liegen alle möglichen, aber noch völlig unbekannte Zwischenstufen. Es sei über diese vermutlichen Kondensationsprodukte noch erwähnt, daß sie weder in Säuren, noch in Basen löslich waren, selbst nicht nach tagelanger Einwirkung. Demgegenüber zeigten sich Niederschläge, die in konzentrierten Säuren (37 Proz. HCl, konzentriertes HNO_3 usw.) hergestellt waren, in Alkalien wieder gut löslich.

Fragt man sich nun, welche Membrankombination befreit möglichst rasch das Serum von seinen Elektrolyten und gestattet eine möglichst schonende und reichliche Darstellung der verschiedenen Eiweißfraktionen, so glauben wir nach unseren Erfahrungen, doch der *Ruppel*schen Anordnung den Vorzug geben zu dürfen, denn bei ihr wird der isoelektrische Punkt erreicht, wenn die Elektrolyte sehr weitgehend entfernt sind (natürlich bei einer nicht zu alten positiven Membran!). Dieses bedingt einen reichlichen Ausfall der Globuline. Bei der Verwendung von zwei Pergamentmembranen wird der isoelektrische Punkt dagegen im allgemeinen bei merklich höherer Elektrolytkonzentration erreicht. Der Ausfall von Eiweiß ist deswegen geringer. Man kommt ferner in ein Gebiet von kleinerem p_H, was vielleicht nicht unbedenklich ist, wenn man das Eiweiß möglichst unverändert erhalten will. Auch kommt man der Wiederlöslichkeitsgrenze des Globulins, etwa 4,0, recht nahe. *Pauli* sucht diese starke Säuerung dadurch zu vermeiden, daß er bei viel kleineren Spannungen elektrodialysiert. Wir können unsere Bedenken gegen die viel längere Zeit, die er dabei benötigt, sowie gegen andere seiner Maßnahmen nicht ganz fallen lassen. Eine möglichst rasche E. D. erscheint uns nach wie vor wünschenswert. Wohl erhebt sich gegen die *Ruppel*sche Anordnung der Einwand, daß die Mittelflüssigkeit vorübergehend alkalisch wird,

und daß dieses die Eiweißkörper in bedenklicher Weise verändern kann. Wenn man aber, wie dieses in Laboratoriumsversuchen in der Regel üblich ist [*Stern*[1]), *Freundlich* und *Loeb*[2])], das Serum stark verdünnt (1 : 5 oder 1 : 10), so ist die Höhe und Dauer der Alkalität gering und unbedenklich. Unsere Versuche wurden absichtlich bei größerer Konzentration ausgeführt, um den Einfluß der verschiedenen Versuchsbedingungen schärfer hervortreten zu lassen.

Zusammenfassung.

I. Zur Erklärung des zeitlichen Verlaufs der E. D. mit der *Ruppel*schen Anordnung muß man im wesentlichen drei Umstände berücksichtigen:

1. ein Hineinwandern von $NH_4^{\cdot}$ aus der positiven Membran in die Mittelflüssigkeit;
2. die von *Bethe* und *Toropoff* dargelegte Ionenverschiebung an den Membranflächen und die dadurch bedingte besondere Ionenwanderung durch die Membran;
3. die von dem Donnangleichgewicht verursachte Membranhydrolyse der Eiweißkörper in der Mittelflüssigkeit.

II. Der Vergleich der verschiedenen Membrankombinationen ergibt folgendes:

Die *Ruppel*sche Kombination ist vorteilhaft, weil der isoelektrische Punkt der Globuline bei kleinen Elektrolytkonzentrationen erreicht wird, wodurch ein reichlicher Globulinausfall gewährleistet ist. Ferner gelangt man nicht so weit ins saure Gebiet wie bei der Kombination mit zwei Pergamentmembranen. Bedenklich ist bei der *Ruppel*schen Kombination die vorübergehende Alkaleszenz der Mittelflüssigkeit. Sie läßt sich aber durch genügendes Verdünnen des Serums vermeiden.

---

[1]) l. c., s. S. 444 (1. Mitteilung.)
[2]) l. c., s. S. 444.

Experimentelle Acidose und Alkalose des Gewebssaftes bei Fröschen und die Veränderung der zytoplasmatischen Strukturen.

Vorläufige Mitteilung.

Von

A. Rumjantzew.

(Aus dem Kabinett für Histologie und Embryologie, Universität zu Moskau.)

(Eingegangen am 4. März 1926.)

In meiner vorigen Arbeit[1]) ist es mir gelungen, die Grenzen der Unveränderlichkeit plasmatischer Strukturen der Zellen von parenchymatösen Geweben, die verschiedenen Organen des Frosches entnommen waren, festzustellen. Es erwies sich, daß in den kleinen ausgeschnittenen Stückchen, wenn sie ¼ bis ½ Stunde in physiologischer Lösung mit einer Reaktion p_H 6 bis p_H 7,8 liegen, keinerlei Veränderungen bemerkbar sind. Nach Überschreitung dieser Grenzen kommen bald charakteristische Veränderungen zum Vorschein, welche die Zelle in den Zustand der trüben Schwellung bringen. Der Zweck vorliegender Arbeit war die Erforschung der Veränderung der zytoplasmatischen Strukturen derselben Gewebe bei künstlicher Acidose und Alkalose und der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit denjenigen der vorhergehenden Arbeit.

Nach den Versuchen von *Rohde* (1920)[2]) sind die Frösche ein für diesen Zweck sehr geeignetes Objekt, da sich bei ihnen bei Einführung von Säure oder Alkali subkutan in den Lymphsack oder per os die Reaktion nicht bloß des Harns von p_H 3 bis 10, sondern auch die des Blutes von p_H 4,2 bis 8,7 scharf verändert. Von diesen Ergebnissen ausgehend, konnte man vermuten, daß auch der Gewebssaft dieser Tiere bei Acidose und Alkalose ebenso schroff seine Reaktion verändert.

Material und Methode der Untersuchung.

Die Experimente wurden im Sommer 1925 angestellt. Die im Freien gefangenen Tiere wurden 24 Stunden vor Beginn des Experimentes im Laboratorium gehalten. Zum Experimente wurden 30 und in einigen Fällen auch mehr Frösche genommen.

---

[1]) Im Druck.

[2]) *Rohde*, Pflügers Arch. 182, 114, 1920.

Von den ausgewählten Fröschen wurden fünf Exemplare vor Beginn des Experiments seziert, um die Reaktion des Gewebssaftes verschiedener Organe festzustellen. Die Durchschnittszahlen der vorgefundenen p_H-Werte dienten als Kontrollziffern. Den übrigen Fröschen wurden zur Hervorrufung der Acidose 2 ccm gesättigter Lösung von Borsäure in den Lymphsack eingeführt und zur Hervorrufung von Alkalose 1 oder ½ ccm gesättigter Lösung von Carbonatsoda. Nach Verlauf einer bestimmten Zeit, im Laufe der ersten Stunde nach ¼, ½ und 1 Stunde, und weiterhin jede 2 Stunden bis zu 12 Stunden und ferner alle 6 Stunden, wurde die Reaktion des Gewebssaftes bei zwei Fröschen bestimmt.

Im ganzen sind sowohl für die Acidose als auch für die Alkalose je drei Experimente angestellt worden. Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt, so daß zur Bestimmung von p_H 180 Frösche geöffnet worden sind. Die Reaktion wurde nach dem von *Gräff* (1924)[1] beschriebenen Verfahren mit geringfügigen Veränderungen vorgenommen mit Hilfe von *Clarks* Indikatoren. Die Bestimmung wurde nach sorgfältiger Entfernung des Blutes aus dem Stückchen rasch vollzogen; die Schnelligkeit ist eine unumgängliche Bedingung, da die Autolyse der Stückchen sich durch eine Verschiebung der Reaktion nach der sauren Seite hin fühlbar macht. Die Wirkung der autolytischen Prozesse kann sich schon nach 10 Minuten offenbaren. Für Bestimmung von $p_H^{\cdot}$ des Gewebssaftes muß man gleichzeitig mit mehreren Indikatoren arbeiten, da man bei der Arbeit mit bloß einem zu ganz unrichtigen Werten gelangen kann.

Die unten angeführten Zahlen sind nicht absolut genau; der wahrscheinliche Irrtum ist 0,2 des Wertes von p_H.

Die Reaktion des Gewebssaftes normaler Tiere:

Haut	7,2	bis	7,4
Pankreas	6,9	„	7,0
Nieren	6,8	„	6,9
Leber	6,7	„	6,8
Muskelgewebe	6,5	„	6,6
Harnblase	7,0	„	7,2
Harn	6,4	„	6,6

Die angeführten Daten weisen vor allem auf einen Unterschied in der Reaktion der Haut und der parenchymatösen Organe hin und gleichzeitig auf eine stark acide Reaktion der Muskeln. Dieser Unterschied der Reaktion (saure Reaktion der Haut und alkalische der tätigen Organe) ist von *Schmidtmann* (1925)[2] und *Raus* (1925)[3] bemerkt worden.

[1]) *Gräff*, s. Zieglers Beitr. 72, 603, 1924.
[2]) *Schmidtmann*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 55, 714, 1925.
[3]) *Raus*, Journ. of exper. Med. 61, Nr. 4, 6, 1925.

Tabelle I.

Die Entwicklung der Acidose bei den Fröschen.

Versuch Nr. 4 am 1. Juli 1925.

Die Zeit nach Beginn des Experiments	1/2	1	3	5	7	9	12	24	48	72
Haut	6,8	7,1	7,0—7,2	7,1—7,2	7,1—7,2	7,1—7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
Pankreas	6,5	6,5—6,3	6,2—6,4	6,2—6,4	6,4	6,4—6,6	6,4—6,6	6,7—6,8	6,8—7	6,8—7
Niere	6,7—6,8	6,7—6,8	6,6—6,8	6,6—6,7	6,6—6,7	6,8	6,8	6,9	6,9	6,9—7
Leber	6,4—6,5	6,5—6,6	6,3—6,4	6,4—6,6	6,3	6,3—6,4	6,4—6,6	6,6—6,7	6,6—6,7	6,7—6,8
Muskelgewebe des Fußes	6,0	6,0—5,8	6,0—6,2	5,8—6,0	6,2—6,3	6,3—6,4	6,4—6,6	6,4—6,6	6,4	6,4
Harn									4,6—4,8	5,1—5,2

Tabelle II.

Die Entwicklung der Alkalose bei den Fröschen.

Versuch Nr. 9 am 4. Juli 1925.

Die Zeit nach Beginn des Experiments	1	3	6	12	24	36	48	72
Haut	7,6	7,6	7,5—7,6	7,6	7,4	7,4	7,2	7,2
Pankreas	7,0	6,9—7,1	6,9—7,1	7,0	7,0—7,1	6,8	6,9	6,8—6,9
Niere	7,6	7,2—7,4	7,3	7,2	7,3	7,1	7 —7,1	6,8—7
Leber	7,0	7	6,6	6,8	6,7—6,9	6,7—6,8	6,6	6,6—6,8
Muskelgewebe des Fußes	6,8	6,6—6,8	6,8		6,8	6,6	6,4—6,6	
Harnblase				7,4—7,6	7,4	7,3	7,1—7,3	
Harn	7,6	7,9	8,6	7,6		8,4	7,8	
Exsudat aus Leibeshöhle					7,8			

Acidose. Nach Einspritzung von Säure äußert sich die Acidose der Gewebe sofort nach Einführung der Säure in den Lymphsack, jedoch erreicht ihre Entwicklung nicht mit einem Male das Maximum. Bei allen drei Experimenten stellt sich das Maximum der Säuerung gewöhnlich in 4 bis 6 Stunden nach Beginn des Experimentes ein, einige Zeit hält sich das Maximum und fällt dann nach Verlauf der achten bis neunten Stunde. Nach 12 bis 16 Stunden war die Reaktion des Gewebssaftes wieder normal, mit Ausnahme des Harns, bei welchem das Absinken der Acidität p_H 4,6 einmal nach 48 Stunden beobachtet wurde.

Aus den angestellten Experimenten ergab sich, daß

1. die Acidose das Maximum im Gewebssaft der Haut und in den Muskeln am schnellsten erreicht;

2. die größte Säuerung im Vergleich zur Norm wird bei den Muskeln beobachtet (Säuerung um 0,6 des p_H-Wertes), dann im Pankreas und Leber um p_H 0,4 und endlich in den Nieren um p_H 0,3;

3. die Reaktion des Harns nach 2 bis 3 Tagen gewöhnlich p_H 5,5 ist, jedoch wurde manchmal auch eine Reaktion p_H 5,1 und 4,6 beobachtet;

4. der Gewebssaft der Nieren und der Wände der Harnblase nie zu stark gesäuert wird, p_H der Harnblase ist etwa 7.

Alkalose. 1. Dieselbe entwickelt sich schnell und hält sich längere Zeit.

2. Der Gewebssaft verschiedener Organe alkalisiert sich verschieden. Die größte Alkalisierung erfahren Niere und Leber um 0,4 des Wertes von p_H. Haut, Fußmuskeln und Harnblase steigern ihre Alkalität nicht mehr als um p_H 0,2, und Pankreas wird noch weniger alkalisiert, sein Gewebssaft bleibt fast normal.

3. Die größte Steigerung der Alkalität wurde beim Harn beobachtet, $p_H = 8,6$. Ebenso wie bei der Acidose bleibt der Harn im Vergleich zu den Geweben längere Zeit alkalisch, da schon am zweiten Tage die Alkalose vorbei ist, der Harn aber noch immer alkalisch ist, wenngleich er normalerweise schwach sauer und als Ausnahme neutral ist.

Aus den vorgenommenen Experimenten kann man folgende Schlüsse ziehen:

Durch Einführung von Alkalisalz oder Säure mit guten Puffereigenschaften kann man die Reaktion des Gewebssaftes bei Fröschen verändern. Was die Reaktion des Blutes anbetrifft, so hat sich bei Anwendung der Indikatorenmethode (Ergebnisse von *Stscherbakoff*) eine genaue Bestimmung seines p_H als unmöglich erwiesen. *Joumain* (1925)[1]) hat dieses für Bromthymolblau genau erforscht.

[1]) *D. Joumain*, C. r. soc. Biol. **92**, Nr. 28, 1925.

Soweit man jedoch sogar nach im Sinne der Genauigkeit falschen Zahlen urteilen kann, verändert sich p_H des Blutes weder bei Alkalose noch bei Acidose, was auch theoretisch wahrscheinlicher ist als die Ergebnisse von *Rohde*.

Unsere Befunde bestätigen nicht die für den Harn von *Rohde* angeführten Data — im ganzen ist die Grenze der Schwankungen sowohl nach der aciden als auch nach der alkalischen Seite hin eine geringere als die von *Rohde* festgestellte.

Tabelle III.

	Nach *Autor*			Nach *Schmidtmann*		
	Acidos.	Norm.	Alkal.	Acidos.	Norm.	Alkal.
Haut	6,8—7	7,2—7,4	7,5—7,6	6,3—6,5	7,2 / 6,8	7,4
Pankreas . .	6,3—6,5	6,9—7	7,1—7,2			
Niere	6,6—6,7	6,8—6,9	7,6—7,7			
Leber	6,3—6,4	6,7—6,8	7,0—7,2	6,2—6,4	6,7—6,9	7,2—7,4
Muskelgewebe	5,8—6,0	6,5—6,6	6,6—6,8		6,6—6,7	
Harn	4,6—4,8	6,4—6,6	8,4—8,6			

Interessant ist es, zu bemerken, daß unsere Zahlen mit denjenigen von *Schmidtmann* ziemlich genau zusammenfallen, der an denselben Tieren analoge Experimente vorgenommen hat. Wie aus der angeführten Tabelle ersichtlich, gehen *Schmidtmanns* Befunde mit den meinigen nur bezüglich der Haut bei Acidose ziemlich scharf auseinander. Wenn man zuläßt, daß es *Schmidtmann* tatsächlich gelungen ist, die Reaktion des Zellenplasmas festzsutellen, so muß man unbedingt zulassen, daß die inter- und intracellulare Reaktion im Gewebe gleich sind. Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen der vorhergehenden Experimente können wir vor allem folgende Schlüsse ziehen. Die überlebenden Stückchen reagieren auf die Veränderung der Reaktion der physiologischen Lösung in gleicher Weise: die Gewebe von Niere, Leber und Pankreas bleiben bei Veränderung der Reaktion von p_H 6 bis 8 (d. h. bei einer Schwingung von p_H 2) im Verlauf von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde unverändert. Solche Schwankungen werden im Organismus nicht beobachtet. Die Leber von 6,3 bis 7,2, Pankreas 6,3 bis 7,2 und Niere von 6,6 bis 6,7, d. h. Leber und Pankreas sind mehr der Acidose und Niere der Alkalose unterworfen. Im ganzen ist die Schwankung p_H 0,9 bis 1. Im Vergleich zu den überlebenden Stückchen ist sie geringer, jedoch können wir auch bei diesen Veränderungen der Reaktion schon auf den Anfangsstufen der Acidose und Alkalose charakteristische Veränderungen beobachten, die man in höheren Konzentrationen von H- bzw. OH-Ionen beim Überleben der ausgesonderten Stückchen

beobachten kann. Auf diese Weise reagiert also das Gewebe als ganzes als Organ durch Veränderung seiner Zytostruktur anders, als das Gewebe in Form eines Stückchens.

Meine vorläufigen Beobachtungen haben gezeigt, daß die Veränderungen der zytologischen Strukturen ungefähr in derselben Richtung wie bei Quellung des Stückchens eines Organs außerhalb des Organismus verlaufen, d. h. das Chondriom verwandelt sich bei Acidose oder Alkalose in allen Geweben schon in den Anfangsstadien in rundliche Kügelchen oder angequollene Stäbchen, und bei Acidose löst es sich manchmal sogar wieder auf, jedoch erreichen die Veränderungen der Zytostruktur der Zelle niemals den Grad der vollständigen trüben Quellung, d. h. den Moment der Entmischung der Protoplasmas, welches sich morphologisch im Erscheinen der Vacuolisation äußert. Das Chondriom ist, wie *Cowdry*[1]) richtig hervorhebt, eine ungemein fein reagierende Struktur, die bei jeder Funktionsstörung eines Organs durch eine Formveränderung reagiert, die Verschiebung der Reaktion, nur 0,2 bis 0,4, ruft schon Veränderungen in der Struktur des Chondrioms der Gewebe eines ganzen Organs hervor.

---

[1]) *E. Cowdry*, Carnegie Inst. Bull. Contr. to Embr. Nr. 25. Washington 1918.

Bemerkung zu der Arbeit von Wilhelm Starlinger „Über das Verhalten neutraler Natriumcaseinate bei Membranhydrolyse“[1]).

Von

M. Polanyi.

(Eingegangen am 6. März 1926.)

Die Diskussion, deren historischer Verlauf in der vorangehenden Notiz geschildert ist, hat zu einer Übereinstimmung des experimentell feststellbaren Verhaltens von Caseinlösungen geführt. In Abweichung von den Schlußfolgerungen von Herrn *Starlinger* möchte ich jedoch betonen, daß ich keine Möglichkeit dafür sehe, daß organische Salze aus einer Caseinlösung herausdiffundieren, wenn sie nicht vorher in dieser vorhanden waren. Die Tatsache, daß die Gesamtmenge der leitenden Bestandteile bei der Dialyse kaum zunimmt, führt zu dem Schluß, daß die Menge der organischen Salze bei diesem Vorgang unverändert bleibt und somit auch ursprünglich einen erheblichen Teil der Leitfähigkeit bedingt hat.

---

[1]) Diese Zeitschr. **170**, 1, 1926.

Über das Verhalten neutraler Natriumcaseinate bei Membranhydrolyse.

Von

Wo. Pauli.

(Ergänzung der obigen Bemerkung des Herrn *M. Polanyi.*)

(Eingegangen am 12. März 1926.)

Den Kernpunkt der ganzen Diskussion bildete die Frage nach der Leitfähigkeit des Caseinations. Die Caseinationen sind, wie sich zeigte, das organische Ion in neutralen, unzersetzten Caseinatlösungen, in Analogie mit allen anderen Proteinarten. Erst durch Membranhydrolyse, die in den Versuchen *Polanyis* und seiner Mitarbeiter zur Wirkung kam, treten je nach der Membrandichtigkeit (neben meist geringen Mengen von Caseinationen) Na-Ionen mit Ionen von Caseosen (abgebautem Casein) und mit OH' bzw. HCO_3' (infolge fast vollständiger Reaktion der dünnen Lauge mit der Luft-CO_2) in die Außenflüssigkeit. Da sich die mittlere Anionenbeweglichkeit dabei wenig ändert, bleibt auch die auf das Ausgangsvolumen bezogene Gesamtleitfähigkeit praktisch gleich. Damit erscheint der ganze Sachverhalt erschöpft.

Über den Mechanismus der Milchsäurebildung bei Phanerogamen.

Von

Carl Neuberg und Günther Gorr.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie zu Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 25. Februar 1926.)

Seit langem weiß man, daß im Stoffwechsel tierischer Zellen und vieler Mikroorganismen die *Milchsäure* eine außerordentlich wichtige Rolle spielt. Die Forschungen des letzten Jahrzehntes haben gelehrt, daß die Fähigkeit zur Produktion von Milchsäure eine der verbreitetsten Eigenschaften der lebenden Zelle überhaupt darstellt. Über die *Bedeutung der Milchsäure* im Haushalt der *höher organisierten Vegetabilien* liegen kaum Erfahrungen vor, selbst für das bloße *Vorkommen* von Milchsäure bei grünen Pflanzen sind nur dürftige und unsichere Unterlagen vorhanden.

In *Körnern* und *Pflanzensäften*, z. B. bei Gerste, Mais, in Kartoffeln, bei Tausendgüldenkraut (Erythraea centaurium) und in der Agave, ist eine Anwesenheit von Milchsäure, zumeist von racemischer Säure, beobachtet[1]). In den Blättern der Himbeere, Brombeere sowie im Safte der Kirsche sind nach *H. Franzen* und seinen Mitarbeitern[2]) wechselnde Mengen Milchsäure, oft allerdings nur Spuren, zugegen; doch ist es nach *Franzen* und *Keyssner* (l. c.) unentschieden, ob sie präformiert oder durch bakterielle Gärung nachträglich entstanden ist. Eine typische Vorstufe der Milchsäure, die dem Lactacidogen der tierischen Zelle entsprechen würde, hat *R. Flury*[3]) in Kartoffeln, Lupinen und Spinat nicht aufzufinden vermocht, obgleich *J. Bodnár*[4]) den wichtigen Nachweis geliefert hat, daß zum mindesten den Erbsen ein Phosphorylierungsvermögen eigen ist. Es läßt sich bisher nichts darüber aussagen, ob der nach dem gegenwärtigen Stande der Erkenntnis jedenfalls seltene und geringfügige Gehalt der Vegetabilien an Lactat etwa mit einem schnellen Verbrauch zusammenhängt.

---

[1]) *W. Windisch*, Zeitschr. f. Spiritusind. **10**, 157, 1888; *J. Habermann*, Chem. Zeitung **30**, 40, 1906; *Wm. Mc George*, Chem. Centralbl. **1918**, I, 309.

[2]) *H. Franzen* und *E. Stern*, H. **115**, 283, 1921; **121**, 220, 1922; *H. Franzen* und *E. Keyssner*, H. **116**, 168, 1921; **129**, 319, 1923; *H. Franzen* und *F. Helwert*, H. **122**, 85, 1922; **127**, 38, 1923.

[3]) *R. Flury*, diese Zeitschr. **146**, 297, 1924.

[4]) *J. Bodnár*, diese Zeitschr. **165**, 1, 1925.

G. Ciamician und *C. Ravenna*[1]) haben gezeigt, daß bestimmte Gewächse (Spinat, Bohnen) zugefügtes Lactat angreifen; es wird dabei teils oxydativ unter Abspaltung von Acetaldehyd, teils durch Umwandlung in ätherunlösliche Stoffe (Resynthese ?) verändert.

Das spärliche Auftreten der Milchsäure steht im bemerkenswerten Gegensatz zur häufig beobachteten Gegenwart von *Essigsäure* und *Ameisensäure*. Für erstere hat schon vor 20 Jahren *C. Wehmer* 118 Fundorte, für letztere 80 Fundstätten im Reiche der grünen und chlorophyllfreien Pflanzen beschrieben. Freilich muß man namentlich bei den Formiaten auch an eine sekundäre Bildung denken, sobald das Pflanzenmaterial mit Säuren destilliert worden ist. Von einem Vorkommen der Milchsäure in Samenpflanzen hat *J. Stoklasa*[2]) berichtet; von ihm rührt die Angabe her, daß bei der anaeroben Atmung in Zuckerrüben, Gurken, Bohnen und Kartoffeln neben Äthylalkohol und Kohlendioxyd auch Milchsäure vorhanden ist; in komplexer Reaktion sollen hier ebenfalls Essigsäure, Ameisensäure sowie Wasserstoff, die beiden letzteren über das Methan, weiterhin entstehen.

Über die Menge solcher im Atmungsprozeß erzeugter Milchsäure finden wir folgende Daten bei *Stoklasa* und seinen Mitarbeitern. 0,82 Proz. Milchsäure ist der höchste angeführte Wert; er wurde bei 1 kg Gurkenmasse (als Trockensubstanz) während 100stündiger anaerober Atmung bei 20° erreicht. Aus 5 bis 6 kg frischen Pflanzenmaterials wurden durch Auspressung unter 400 Atmosphären Druck 500 ccm zellfreier Saft erhalten, aus dem mit Alkohol-Äther 6 bis 10 g Rohenzym niedergeschlagen wurden. 25 g dieses Fermentpräparats erzeugten innerhalb 52 Stunden aus 250 ccm 15proz. Traubenzuckerlösung bei antiseptisch geführter Gärung 0,53 g d, l-Milchsäure. Diese im Wasserstoffstrom erzielte Ausbeute sank beachtenswerterweise bei Zuleitung von Sauerstoff auf 0,13 g herab.

Unter gleichen Bedingungen lieferten 10 g Rohenzym aus Gerstenkeimlingen durch eine anaerobe Glykolyse 0,33 g Milchsäure. Etwas niedrigere Werte teilte *J. Bodnár* für das abgeschiedene Ferment der Kartoffelknollen und Zuckerrübenwurzeln mit[3]).

In erheblich einfacherer Weise als den Prager Autoren ist es *G. Muenk*[4]) gelungen, das glykolytische Ferment von der intakten Pflanzenzelle abzutrennen. Er verfuhr dabei analog der Vorschrift,

---

[1]) *G. Ciamician* und *C. Ravenna*, Chem. Centralbl. **1919**, III, **386**; **1921**, I, 95.

[2]) *J. Stoklasa*, Chem. Centralbl. **1905**, I, 265; *J. Stoklasa*, *A. Ernest* und *K. Chocenský*, H. **50**, 303, 1907; **51**, 156, 1907.

[3]) *J. Bodnár*, diese Zeitschr. **73**, 202, 1916.

[4]) *G. Muenk*, Chem. Centralbl. **1915**, I, 163; Landw. Versuchsst. **85**, 396, 1914.

die von *Neuberg* sowie *Dakin* und *Dudley* zur Gewinnung des aus Methylglyoxal Milchsäure bildenden tierischen Ferments angegeben worden war (s. unten), und hat behauptet, direkt durch Extraktion der zerkleinerten Samen von gelber, weißer und blauer Lupine mit physiologischer Kochsalzlösung ein Enzym isoliert zu haben, das mit großer Leichtigkeit aus Stärke, Glykogen, Inulin, Traubenzucker, Galaktose, Maltose, Rohrzucker, namentlich aber aus Milchzucker Milchsäure bildet und gegen Antiseptika, wie Toluol oder Fluornatrium, wenig empfindlich ist.

Alle die erwähnten Angaben über die Bildung von Milchsäure im Eigenstoffwechsel der grünen Gewächse werden von *Fr. Czapek* (Prag) sowie *C. Oppenheimer* in ihren bekannten Lehrbüchern mit äußerster Skepsis beurteilt.

Bei den besonders gearteten energetischen Verhältnissen der höheren Pflanzen würde das „Fehlen“ von Milchsäure unter normalen Verhältnissen ebenso erklärlich erscheinen wie für den ordnungsmäßig funktionierenden Tierkörper. Falls bei den vorerwähnten positiven Befunden die Mitwirkung von Bakterien keine Rolle spielt, kann angenommen werden, daß es bei den vegetabilischen Zellen hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen zu einer Anhäufung von Lactat kommen kann.

Wenn nun die Fähigkeit zur Milchsäurebildung in der Tat ein Attribut auch der höheren Pflanzenzelle ist, so durften wir erwarten, daß sie diese Säure aus derselben Vorstufe bildet, die wir heute mit guten Gründen für die tierischen Gewebe und die Bakterienzellen als Milchsäurequelle annehmen.

Durch die Untersuchungen von *C. Neuberg*[1]), *H. D. Dakin* und *H. W. Dudley*[2]) sowie *P. A. Levene* und *G. M. Meyer*[3]) ist für animalische Organe der Beweis erbracht worden, daß sie sehr glatt Methylglyoxal in Milchsäure überzuführen vermögen. Für die entartete Zelle der Tumoren gilt nach *O. Warburg, K. Posener* und *E. Negelein*[4]) ein Gleiches. Mit der seit mehr als einem Jahrzehnt von uns vertretenen Ansicht, daß die Milchsäure als Stabilisierungsprodukt des Methylglyoxals anzusprechen ist, steht das Verhalten der in den Zellen vorhandenen, das Methylglyoxal umwandelnden Ketonaldehydmutase in bestem Einklang, indem dieses Enzym nach *O. Meyerhofs*[5]) Befunden den Charakter eines typischen Stoffwechselferments aufweist.

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **49**, 502, 1913; **51**, 484, 1913.

[2]) *H. D. Dakin* und *H. W. Dudley*, Journ. of biol. Chem. **14**, 155 und 423, 1913; **16**, 505, 1914.

[3]) *P. A. Levene* und *G. M. Meyer*, ebendaselbst **14**, 551, 1913.

[4]) *O. Warburg, K. Posener* und *E. Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 316, 1924.

[5]) *O. Meyerhof*, ebendaselbst **159**, 432, 1925.

Wie wir früher dargetan haben[1]), kann auch in *niedrig organisierten pflanzlichen Gebilden*, bei verschiedenen Bakterien, Methylglyoxal als Vorstufe der Milchsäure gelten. Für drei verschiedenen Gruppen angehörende Vertreter, für den Lactobacillus, das Bacterium coli sowie für den Bacillus propionicus, ist ein solches Verhalten außer allen Zweifel gesetzt. (Der erstgenannte Mikroorganismus ist ein regelrechter Milchsäurebildner; wir haben mit ihm die Vergärung von Glucose zu Milchsäure im Umfange von 91,2 Proz. bewirkt.)

Im Hinblick auf das Problem, ob in der ganzen belebten Natur eine einheitliche Bedeutung der Milchsäure zur Geltung kommt und ob ihr hauptsächlicher Bildungsmechanismus überall als ähnlich vorausgesetzt werden darf, haben wir eine Prüfung der *Frage* für wichtig gehalten, *ob Zellen höherer Pflanzen Methylglyoxal in typischer Weise zu Milchsäure dismutieren.* Als geeignete Objekte ermittelten wir die *Erbsensamen*, die zugleich den Vorzug leichter Zugänglichkeit besitzen. Wie wir gefunden haben, enthalten diese das Methylglyoxal angreifende Ferment in so reichem Maße, daß man die ruhenden Samen benutzen kann, und nicht durch vorangehende Keimung ihren verlangsamten Stoffwechsel anzufachen braucht. Da man mit starken antiseptischen Mitteln arbeiten kann, so kommt eine Beteiligung von Mikroben nicht in Betracht. Man kann die vorher mit 1prom. Sublimatlösung keimarm gemachten Erbsen, sodann die nicht vorbehandelten Erbsen in Gegenwart von reichlich Toluol, weiterhin Aceton-Trocken-Erbsen, ferner wässerige Auszüge gemahlener Erbsen sowie die durch Fällung mit Alkohol-Äther aus solchen Wasserextrakten von Erbsen erzeugten Niederschläge (nach ihrer Wiederauflösung) unter Beigabe von Toluol benutzen. Überall ist das Ferment vorhanden, das unter Luftabschluß längstens in einem Tage 1- bis 2prom. Lösungen des Methylglyoxalhydrats quantitativ umwandelt. Dabei sind 70 bis 80 Proz. der theoretisch möglichen Menge Milchsäure nachgewiesen worden. An der als *Zinklactat* abgeschiedenen Substanz wurde konstatiert, daß die racemische Säure vorlag. Dieser Befund deckt sich mit den Erfahrungen von *J. Gadamer*[2]), *J. N. Currie*[3]) sowie *A. W. Dox* und *R. E. Neidig*[4]), daß die Bildung von inaktiver Säure auch bei manchen Bakterien bevorzugt ist; *Franzen* (l. c.) hat in den Blättern und Früchten grüner Pflanzen ebenfalls nur d, l-Lactat beobachtet.

Wir haben den ruhenden Erbsensamen frei von präformierter Milchsäure befunden, so daß dieses in so vielfachen Zubereitungen

---

[1]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **162**, 490, 1925; **166**, 482, 1925.

[2]) *J. Gadamer*, Apothek.-Zeitschr. **12**, 642, 1897.

[3]) *J. N. Currie*, Journ. biol. Chem. **10**, 201, 1911.

[4]) *A. W. Dox* und *R. E. Neidig*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **3**, 257, 1913.

anwendbare Erzeugnis ein brauchbares Material für das Studium der Ketonaldehydmutase bei höheren Pflanzen abgibt.

Es hat sich bereits herausgestellt, daß solche Fermentpräparate und ähnliche aus Bohnen und Lupinen nicht nur auf Methylglyoxal, sondern auch auf analoge Glyoxale einwirken. Nach Versuchen, die Herr *Binder-Kotrba* ausgeführt hat, erzeugt das Erbsenenzym aus Phenylglyoxal in praktisch quantitativer Ausbeute rechtsdrehende Mandelsäure.

Vor einiger Zeit haben *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*[1]) am gleichen Objekte, am Erbsensamen, gezeigt, daß die von ihm ausgelöste alkoholische Gärung analog der Zuckerspaltung durch Hefe verläuft, indem sie hier gleichfalls über die Zwischenstufe des Acetaldehyds fortschreitet. In der jetzt beschriebenen reichlichen und leichten Bildung von Milchsäure erblicken wir einen Anhalt dafür, daß die im Effekt der alkoholischen Gärung sich schon offenbarende Fähigkeit der grünen Pflanzen zur Glykolyse unter bestimmten Bedingungen auch mit einer Ansammlung von Milchsäure zutage tritt, d. h. mit der *Stabilisierung des Intermediärprodukts Methylglyoxalhydrat*, das sich in der Regel — im Sinne der Ausführungen von *C. Neuberg* und *M. Kobel*[2]) — weder anhäuft noch umlagert, sondern der Restitution unterliegt.

Jedenfalls verfügen die Phanerogamen über das vom lebenden Gewebe abtrennbare Stoffwechselferment, das am Methylglyoxal die bedeutsame Verschiebung in der Drei-Kohlenstoffreihe besorgt, und damit ergibt sich eine wesentliche Übereinstimmung im Grundtypus der Kohlenhydratumwandlung für die Zellen der grünen Pflanzen, der Tiere sowie der Mikroorganismen.

Für alle Versuche wurden „Hohe Erfurter Zuckererbsen" verwendet.

I. Versuche mit frischem, in Sublimat gewaschenem Erbsensamen.

Eine größere Menge der Samen wurde auf eine ausgedämpfte Porzellannutsche gebracht, deren untere Öffnung durch einen Gummistopfen verschlossen war. Sie blieben hier 30 Minuten lang mit aufgegossener 1 proz. Sublimatlösung unter öfterem Durchschütteln in Berührung; dann ließen wir die Flüssigkeit ablaufen und wuschen die Erbsen gründlich mit ausgekochtem Leitungswasser auf der Nutsche aus. Unter möglichster Einhaltung der Sterilität wurden darauf die Erbsen im Exsikkator oberflächlich getrocknet und schließlich in einem entkeimten Mörser zerstoßen[1]).

---

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **151**, 167, 1924; **160**, 256, 1925.

[2]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, Zeitschr. f. angew. Chem. **38**, 761, 1925.

a) 25 g der zerriebenen Erbsen,
1000 ccm Leitungswasser,
10 g Calciumcarbonat,
1 g Methylglyoxal,
10 ccm Toluol.

b) 12,5 g Erbsen, ½ Stunde lang mit
500 ccm Wasser gekocht,
5 g Calciumcarbonat,
0,5 g Methylglyoxal,
5 ccm Toluol.

c) 25 g Erbsen,
1000 ccm Wasser,
10 g Calciumcarbonat,
10 ccm Toluol.

d) 250 ccm Wasser,
2,5 g Calciumcarbonat,
0,25 g Methylglyoxal,
2,5 ccm Toluol.

Sämtliche Ansätze wurden in paraffinierten Stöpselflaschen in einen Brutschrank von 37° gebracht.

Nach 20 Stunden war in *a*) das Methylglyoxal restlos verschwunden, wie sich durch Prüfung mit p-Nitrophenyl-hydrazin-acetat in einer kleinen zentrifugierten Probe ergab. Um die entstandene Menge Milchsäure zu bestimmen, wurden 100 ccm des zentrifugierten Ansatzes a) mit Salzsäure und Quecksilberchlorid nach *Schenk* von Eiweiß befreit, wodurch das Volumen auf 120 ccm stieg. 60 ccm dieses Filtrats, aus dem überschüssiges Quecksilber durch Schwefelwasserstoff entfernt war, dienten, nötigenfalls nach vorheriger Vertreibung des durch intramolekulare Atmung entstandenen Alkohols sowie auch der von *Neuberg* u. *Gottschalk* (l. c.) aufgefundenen Acetaldehydmenge, zur Kupfer-Kalk-Fällung, durch welche die in den Erbsensamen vorhandenen Kohlehydrate beseitigt wurden. Das Volumen der Flüssigkeit wurde hierdurch auf 100 ccm erhöht. In 20 ccm klaren Filtrats wurde die Milchsäure nach dem vereinfachten Verfahren der Permanganatoxydation-Titration ermittelt[1]). Hierdurch wurden 9,4 mg Milchsäure gefunden. Nach Umrechnung auf das Gesamtvolumen ergibt sich bei dem Hauptansatz ein Gehalt von 0,94 g an der Oxysäure; das entspricht, auf Methylglyoxal bezogen, 75,2 Proz. der Theorie.

Um zu prüfen, ob auch eventuell mit aufgekochtem Erbsensamen, d. h. durch irgend einen Katalysator, in unspezifischer Weise Methylglyoxal in Milchsäure übergeführt würde, ist *Ansatz b*) zentrifugiert worden. 250 ccm der klaren Flüssigkeit versetzten wir mit einer Lösung von Quecksilberacetat, entfernten aus dem Filtrat das Quecksilber wieder mit Schwefelwasserstoff und bestimmten in einem aliquoten Teile der mit Luft vom Schwefelwasserstoff befreiten Lösung das noch vorhandene Methylglyoxal als p-Nitrophenylosazon. Es

---

[1]) Bezüglich Behandlung der Flüssigkeit und Oxydation zu Aldehyd siehe die Vorschriften von *S. W. Clausen*, Journ. of biol. Chem. **52**, 263, 1922; *H. Hirsch-Kauffmann*, H. **140**, 25, 1924; *O. Meyerhof*, H. **141**, 316, 1924. Zur mikroanalytischen Bestimmung des Aldehyds vgl. die Angaben von *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 176, 1924.

konnten nach Umrechnung auf den Gesamtansatz 78,3 Proz. des zugefügten Ketonaldehyds nachgewiesen werden.

Diese Bestimmung kann indes nur einen ungefähren Anhaltspunkt für eine eventuell unspezifische, unter den Versuchsbedingungen etwa eintretende Methylglyoxal-Umwandlung gewähren, da einerseits die Art der Aufarbeitung, andererseits der in der Lösung vorhandene Zucker, der ebenfalls mit p-Nitrophenylhydrazin reagiert, das Resultat undeutlich machen.

Ansatz c) diente zur Feststellung, ob sich im Erbsenbrei selbst unter den Bedingungen des Versuchs Milchsäure vorfindet. Die in gleicher Weise wie bei a) erfolgte Aufarbeitung ergab für unser Material, daß Ansatz c) keine Milchsäure enthielt.

Durch eine p-Nitrophenylosazon-Bestimmung im digerierten *Kontrollansatz d*) wurde festgestellt, daß bei Beendigung des Versuchs noch 90,4 Proz. des angewendeten Ketonaldehyds unverändert vorhanden waren.

II. Versuche mit Aceton-Trocken-Erbsen.

Dieselben wurden hergestellt, indem der in der Mühle sehr fein zermahlene Erbsensamen zunächst 20 Minuten mit der siebenfachen Menge Aceton, dann nochmals 10 Minuten mit der vierfachen Menge desselben Entwässerungsmittels sorfältig verrieben, darauf nach gründlichem Abpressen auf der Nutsche mit der vierfachen Menge absoluten Äthers in einem Mörser 10 Minuten lang durchgerührt wurde. Durch eine 24stündige Aufbewahrung im *Hochvakuum* über festem Paraffin wurden Aceton bzw. Äther restlos entfernt. (Es hinterbleibt ein staubfeines Pulver, das nahezu weiß ist; denn durch die Behandlung mit Aceton wird der gelbe Farbstoff der Erbsen ausgezogen.)

a) 50 g Aceton-Trocken-Erbsen,
1000 ccm Wasser,
10 g Calciumcarbonat,
1,0 g Methylglyoxal,
10 ccm Toluol.

b) 12,5 g Aceton-Trocken-Erbsen, ½ Stunde lang mit
250 ccm Wasser gekocht,
2,5 g Calciumcarbonat,
0,25 g Methylglyoxal,
2,5 ccm Toluol.

c) 12,5 g Aceton-Trocken-Erbsen,
250 ccm Wasser,
2,5 g Calciumcarbonat,
2,5 ccm Toluol.

d) 250 ccm Wasser,
2,5 g Calciumcarbonat,
0,25 g Methylglyoxal,
2,5 ccm Toluol.

Nach 16 Stunden war das Methylglyoxal in *II a*) total umgesetzt. Die Bestimmungen der in dem Versuch gebildeten Milchsäure erfolgten in völlig gleicher Weise, wie in Versuch I a). Auf den ganzen Ansatz berechnet, wurden 0,98 g Milchsäure oder 78,4 Proz. der Theorie gefunden.

Um die enzymatisch gebildete Milchsäure auch in Substanz zu isolieren und auf ihr optisches Verhalten prüfen zu können, wurden 800 ccm des methylglyoxalfreien Zentrifugats nach Zugabe einer geringen Menge Kreide auf dem Wasserbad bis zu einem Volumen von etwa 200 ccm eingeengt und dann nach Filtration weiter bis auf 60 ccm konzentriert. Durch Versetzen mit der dreifachen Menge heißen absoluten Alkohols wurde jetzt die Hauptmenge der kolloiden Stoffe gefällt; das durch Abdampfen von Sprit befreite Filtrat wurde mit sirupöser Phosphorsäure angesäuert, auf ausgeglühtem Sand aufgesaugt und alsdann durch dreitägige Extraktion im Soxlethapparat ausgezogen. Der nach Verdampfen des als Lösungsmittel benutzten Äthers hinterbliebene Rückstand wurde auf dem Wasserbad zur Entfernung etwa vorhandener flüchtiger Säuren einige Zeit erwärmt und schließlich in bekannter Weise über das Bleisalz in das kristallisierte Zinklactat übergeführt. Es konnten so 0,75 g Rohprodukt erhalten werden. Nach der polarimetrischen Untersuchung sowie nach der Analyse der umkristallisierten Substanz lag reines racemisches Lactat vor.

0,1163 g Substanz gaben bei 105° 0,0212 g Wasser ab.

0,0951 g wasserfreier Substanz lieferten 0,0317 g Zinkoxyd.

$(C_3H_5O_3)_2Zn + 3\ H_2O$. Ber.: H_2O = 18,18 Proz.; gef.: H_2O = 18,23 Proz.

$(C_3H_5O_3)_2Zn$. Ber.: ZnO = 33,47 Proz.; gef.: ZnO = 33,33 Proz.

Die in gleicher Weise wie bei Versuch I b) in *Ansatz II b*) vorgenommene Methylglyoxalbestimmung lehrte, daß mindestens 54 Proz. Methylglyoxal in dem Ansatz noch vorhanden waren; dieser Wert ist aus den Gründen, die zuvor (S. 481) dargelegt sind, zu niedrig.

Die in *Versuch II c*) vorgenommene Milchsäure-analyse ergab für den ganzen Ansatz (1000 ccm) einen Gehalt von 0,002 g der Oxysäure. Da dieser Wert fast innerhalb der Fehlergrenzen des Milchsäurebestimmungsverfahrens fällt, so ist es zweifelhaft, ob bei diesem Versuch wirklich Spuren der Oxysäure aufgetreten waren.

Die Ermittlung des Methylglyoxals im Filtrat von *II d*) ließ erkennen, daß hier bei Beendigung des Versuchs noch 92,5 Proz. des Ketonaldehyds unverändert geblieben waren.

III. Versuche mit Erbsensaft.

Derselbe wurde hergestellt, indem jedesmal 70 g Aceton-Trocken-Erbsen mit 210 ccm Leitungswasser sowie 4 ccm Toluol eine Stunde lang auf einer Maschine bei Zimmertemperatur kräftig geschüttelt und diese Aufschwemmungen dann noch während einer Nacht in einem Eisschrank aufgehoben wurden. Am nächsten Morgen wurde zentrifugiert.

a) 100 ccm Saft,
1 g Calciumcarbonat,
0,2 g Methylglyoxal,
1 ccm Toluol.

b) 10 ccm Saft,
0,1 g Calciumcarbonat,
0,1 ccm Toluol.

Nach 19 Stunden war in *III a*) das Methylglyoxal verbraucht. In 50 ccm Zentrifugat wurde das Eiweiß nach *Schenk* gefällt; hierdurch wuchs das Volumen auf 60 ccm an. 30 ccm des klaren Filtrats dienten zur Weiterverarbeitung; Volumen schließlich 50 ccm. Mit 10 ccm des gereinigten Filtrats führten wir die Bestimmung der Milchsäure aus. Gefunden wurden 9,14 mg. Das macht für den ganzen Ansatz 0,1828 g und, auf das zugefügte Methylglyoxal bezogen, 73,1 Proz. der Theorie aus.

Zur Feststellung, ob auch im Versuch *III b*) Milchsäure entstanden war, wurden 9,0 ccm des Zentrifugats enteiweißt und nach vorschriftsmäßiger weiterer Reinigung quantitativ auf Milchsäure untersucht. Ein durch die kleinen Fehler des Verfahrens hervorgerufener „negativer Milchsäurewert“ zeigte jedenfalls, daß auch bei Verwendung von Saft unter den Versuchsbedingungen aus der Leibessubstanz unserer Erbsen keine Milchsäure hervorgegangen war.

Eine Blindprobe mit Methylglyoxallösung für sich konnte hier fortfallen, da die praktische Unveränderlichkeit des Ausgangsmaterials während der Versuchszeit feststand.

IV. Versuche mit einem Alkohol-Äther-Fällungsprodukt aus Erbsensaft.

100 ccm des in derselben Weise wie für Versuch III gewonnenen Erbsensaftes wurden mit 500 ccm absoluten Alkohols sowie 200 ccm wasserfreien Äthers versetzt; der ausgefallene Niederschlag[1]) wurde

---

[1]) Verwendet man Aceton als Fällungsmittel, so ist der Niederschlag häufiger klebrig, namentlich dann, wenn man den Erbsensaft aus gemahlenen frischen Erbsen (statt aus Aceton-Trocken-Erbsen) bereitet hat.

mit einem Gemisch von 5 Teilen Alkohol und 2 Teilen Äther, genau wie das für ebenso bereitete Zymasepräparate aus Hefensaft üblich ist, rasch gewaschen und im Exsikkator unterhalb 0,5 mm getrocknet.

7 g des so erhaltenen Pulvers,
100 ccm Wasser,
1 g Calciumcarbonat,
0,2 g Methylglyoxal,
1 ccm Toluol.

Nach 20 Stunden war das Methylglyoxal verschwunden. Der Ansatz wurde nunmehr zentrifugiert und auf gleiche Art sowie unter Anwendung derselben aliquoten Teile wie bei Ansatz III a) aufgearbeitet. In den zur Milchsäuretitration benutzten 10 ccm Endlösung (5 ccm Urlösung entsprechend) konnten 9,38 mg dieser Säure ermittelt werden. Das ergibt für den Gesamtansatz 0,1876 g oder, auf das angewendete Methylglyoxal berechnet, einen Milchsäureertrag von 75,0 Proz. der Theorie.

Wie man sieht, verlaufen die Versuche mit den verschiedenen Präparationen des Erbsenferments durchaus gleichsinnig.

Zur Kenntnis der Phosphatase und über die Darstellung von sauren Estern der Pyrophosphorsäure.

Von

Carl Neuberg und **Joachim Wagner.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 10. März 1926.)

I. Neue Substrate der Phosphatase.

Die Gruppe der Phosphatasen besitzt eine in steter Zunahme begriffene Bedeutung, da die Erscheinungen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung sich als wichtige biochemische Vorgänge zu erkennen geben. Die Fähigkeit, Phosphorsäure-ester zu spalten, ist bei tierischen und pflanzlichen Zellen sowie bei Mikroorganismen ausgebildet und weit verbreitet. Die Substrate, welche unter natürlichen Verhältnissen der Zerlegung durch die Phosphatasen ausgesetzt sind, haben eine gemeinsame Eigenschaft. Es handelt sich, soweit bisher ermittelt worden ist, um *Phosphorsäure-ester von Polyhydroxylverbindungen,* nämlich — in der Reihenfolge, in der ihre Angreifbarkeit durch Phosphatase aufgefunden wurde — um Phytin[1]), Hexose-diphosphorsäure[2]) und Glycerin-phosphorsäure[3]), zu denen als verwandte Substanzen die Rohrzucker-phosphorsäure[4]) sowie zwei isomere Hexose-mono-phosphorsäuren[5])[6]) traten. Sieht man von den komplizierter gebauten Phospho-proteinen und den Nucleinsäuren sowie ihren Spaltungsprodukten ab, so sind andere, den Phosphatasen zugängliche Phosphorsäure-derivate in der Natur nicht nachgewiesen worden. Dem Grundtypus der Polyhydroxyl-phosphorsäure-abkömmlinge gehören jedenfalls auch die Pentosen- und Hexosen-phosphate an, die als die letzten spaltbaren Bausteine der Nucleinsäuren zu gelten

---

[1]) *U. Suzuki, K. Yoshimura* und *M. Takaishi,* Chem. Centralbl. **1907**, II. 1637.

[2]) *A. Harden* und *W. J. Young,* Proc. Roy. Soc. [B] **82**, 321, 1910.

[3]) *C. Neuberg* und *L. Karczag,* diese Zeitschr. **36**, 64, 1911.

[4]) *K. Djenab* und *C. Neuberg,* ebendaselbst **82**, 391, 1917.

[5]) *C. Neuberg,* ebendaselbst **88**, 432, 1918; *M. Tomita,* ebendaselbst **131**, 170, 1922.

[6]) *R. Robison,* Biochem. Journ. **17**, 286, 1923.

haben, ferner der jüngst von *J. Greenwald*[1]) entdeckte interessante Blutbestandteil, die Di-phospho-l-glycerinsäure.

Es hat sich herausgestellt, daß den verschiedenen Geweben höher organisierter Lebewesen ein ungleicher Gehalt an Phosphatasen eigen ist. Es steht nicht fest, ob es organspezifische Phosphatasen gibt. Wir wissen ferner nichts darüber, ob die Phosphatasen wechselnder Herkunft identisch oder nur gruppenähnlich sind.

Aus dem häufigen Vorkommen und der Wirkungsstärke der Phosphatasen darf man auf ihre Wichtigkeit für die Stoffwechselprozesse schließen. Wir hielten es daher für eine lohnende Aufgabe, Untersuchungen in der angedeuteten Richtung zu unternehmen. Zunächst berichten wir von Erfahrungen über die *Substrat-spezifität* der Phosphatasen. Dabei bleibt, wie vorweg betont sein möge, vorläufig die Frage unerörtert, ob die beiden von uns geprüften Fermente, *tierische Phosphatase* und *Pilzphosphatase*, miteinander übereinstimmen.

Für diese Untersuchungen war es wichtig, ein Substrat benutzen zu können, das eine leicht kristallisierende, in reinem Zustande zugängliche und für sich auch in wässeriger Lösung beständige Substanz ist. Von allen den vorher genannten, in der Natur vorkommenden Verbindungen, erfüllt keine diese Forderungen. Namentlich ist auch bei keiner derselben eine wirklich einfache analytische Ermittlung beider durch die Hydrolyse freiwerdenden Komponenten möglich.

Ein ausgezeichnet geeignetes Testobjekt fanden wir in dem *Dikaliumsalz* der *Mono-phenyl-phosphorsäure*, das leicht zu bereiten ist und den erwähnten Ansprüchen in jeglicher Hinsicht genügt. Die quantitative Bestimmbarkeit auch seines organischen Paarlings, des Phenols, zählt zu den unschwer und genau ausführbaren analytischen Operationen.

Die Konstatierung, daß *aromatische Phosphorsäure-ester* enzymatisch spaltbar sind, bedeutet zunächst eine wesentliche Erweiterung unserer Kenntnisse vom Mechanismus der Phosphatasenwirkung.

Zum Vergleich mit dem nunmehr als enzymatisch zerlegbar erwiesenen einfachsten Vertreter der aromatischen Phosphorsäureabkömmlinge haben wir eine aliphatische Ester-phosphorsäure herangezogen, die *Mono-äthyl-phosphorsäure*. Diese Verbindung ist schon von *R. H. A. Plimmer*[2]) auf ihre Spaltbarkeit durch Gewebe mit positivem Ergebnis geprüft; er beobachtete, daß ein Enzym der Darmschleimhaut sie angreift, während Leber- und Pankreasextrakte ohne Einwirkung waren.

Die *Feststellung, daß sowohl aromatische als aliphatische Phosphorsäure-ester von tierischer wie pflanzlicher Phosphatase enzymatisch hydro-*

[1]) *J. Greenwald*, Chem. Centralbl. 1925, I, 2633.
[2]) *R. H. A. Plimmer*, Biochem. Journ. 7, 43, 1913.

lysiert werden können, scheint uns bemerkenswert, namentlich im Hinblick auf den von uns[1]) erbrachten Nachweis, daß die den Phosphorsäure-estern vergleichbaren und ähnlich gebauten sauren Schwefelsäure-ester, die sogenannten *Äther-schwefelsäuren*, ein streng spezifisches Verhalten gegenüber dem zugehörigen Ferment, der *Sulfatase*, zeigen.

Nur solche Äther-schwefelsäuren, die sich von ungesättigten Ringsystemen (Benzol, Naphthalin, Indol, Chinolin) ableiten, also solche mit phenolischem Paarling, sind sulfatatisch hydrolysierbar, während die aliphatischen und hydroaromatischen Äther-schwefelsäuren sich gegenüber der pflanzlichen wie tierischen Sulfatase als widerstandsfähig herausgestellt hatten. [Ob die Klasse der Schwefelsäure-ester von Senföl-glykosiden als eine Ausnahme von dieser Regel zu betrachten ist, muß dahingestellt bleiben; denn wie bei den Phosphorsäure-estern der Purin- und Pyrimidinglykoside (Nucleinsäuren) wirken hier anscheinend mehrere Enzyme zur Herbeiführung der kompletten Zerlegung zusammen, und es ist noch nicht geprüft[2]), ob die sulfatatische Komponente mit der gewöhnlichen Sulfatase, dem Enzym der Phenol-äthersulfate, identisch ist.]

Das *Wirkungsbereich der Phosphatasen erweist sich nun als noch breiter*. Die angeführten, der Phosphatase zugänglichen Naturprodukte von aliphatischem Charakter sowie Mono-phenyl- und Mono-äthylphosphorsäure sind ausnahmslos *Derivate der mono-substituierten Orthophosphorsäure*, deren Salze dem Symbol $RO . PO . (OM)_2$ entsprechen. Wir haben gefunden, daß auch die Salze des sekundären *Di-phenylphosphorsäure-esters* von der Zusammensetzung $(C_6H_5 . O)_2PO . OM$ spaltbar sind, und zwar, soweit unsere gegenwärtigen Erfahrungen reichen, durch *Nieren- und Pilz-phosphatase*. Einen tertiären Phosphorsäure-ester, das Triphenylphosphat, $(C_6H_5O)_3PO$, haben wir bisher, wenigstens mit Pilzphosphatase, enzymatisch nicht zu hydrolysieren vermocht. Dagegen hat sich in auffallender Weise und auf bemerkenswerte Art aus der bisher wenig bekannten Körperklasse der *Pyrophosphorsäure-ester* die Di-phenyl-pyro-phosphorsäure in Form ihres Di-kaliumsalzes

$$\begin{array}{l} \quad\quad\quad\;\, \diagup OC_6H_5 \\ KO{-}P \overset{\leftarrow}{=} O \\ \quad\quad\quad\;\, \rangle O \quad = (C_6H_5)_2K_2P_2O_7. \\ KO{-}P \overset{\leftarrow}{=} O \\ \quad\quad\quad\;\, \diagdown OC_6H_5 \end{array}$$

als glatt dem enzymatischen Angriff zugänglich erwiesen. Diese Substanz wird sowohl durch animalische als vegetabilische Phosphatase in kurzer Zeit zu praktisch 100 Proz. zerlegt.

Da das *Di-kaliumsalz der Di-phenyl-pyro-phosphorsäure* leicht zu bereiten ist, hervorragend kristallisiert, beständig ist und zugleich

[1]) *C. Neuberg* und *J. Wagner*, diese Zeitschr. **161**, 492, 1925.

[2]) Vgl. *C. Neuberg* und *K. Kurono*, ebendaselbst **140**, 295, 1923; *C. Neuberg*, Die Naturwissenschaften **12**, 797, 1924.

analytisch gut bestimmbare Spaltprodukte liefert, so bietet es gleich dem Mono-phenyl-ortho-phosphat ein sehr günstiges Material für das Studium der Phosphatasen dar.

Die sich nunmehr offenbarende weitreichende Wirksamkeit der Phosphatase darf wohl ohne Zwang mit der großen Verbreitung der Phosphatasen in der Natur und mit der erheblichen Bedeutung der verschiedensten organischen Phosphorsäure-verbindungen für biochemische Prozesse ganz allgemein in Verbindung gebracht werden.

Pyro-phosphorsäure-ester sind bisher nur spärlich bekannt. Außer den neutralen Tetra-alkylestern[1]), die nach den sorgfältigen Untersuchungen von *A. Rosenheim* und seinen Schülern nicht unzersetzt siedende Flüssigkeiten bilden[2]), kennt man dank den Arbeiten von *A. Grün* und *F. Kade*[3]) einen sauren Pyro-phosphorsäure-ester komplizierter Zusammensetzung[4]) als ein Derivat des 2, 3-Distearins, ferner als amorphes, der Reinigung trotzendes Bariumsalz den eigentlich nur als labiles Zwischenprodukt angenommenen sauren Pyro-phosphorsäure-di-äthylester[5]).

Eine *einfache Synthese des reinen und einheitlichen Pyro-phosphorsäure-di-phenyl-esters* gründen wir darauf, daß wir auf eine Pyridinlösung des Anlagerungsproduktes von Phosphoroxychlorid an Pyridin eine Pyridinlösung des Phenols einwirken lassen.

Ein Aufbau von Phosphorsäure-estern mit Hilfe von Phosphoroxychlorid und Basen ist schon früher von *C. Neuberg* und *H. Pollak*[6]) sowie von *E. Fischer*[7]) vorgenommen worden. Während man in wässeriger Lösung zu Derivaten der Ortho-phosphorsäure gelangt, ist es bei Ausschluß von Wasser und Innehaltung der angegebenen Reihenfolge in den Zusätzen möglich, den Pyro-phosphorsäure-ester zu gewinnen. Wählt man die Verhältnisse so, daß ein kleiner Überschuß an Phosphoroxychlorid (1,4 mol.) über das Phenol (1 mol.) vorhanden

[1]) *F. Cavalier*, Chem. Centralbl. **1906**, I, 1525.

[2]) *A. Rosenheim*, *W. Stadler* und *F. Jacobsohn*, B. **39**, 2842, 1906; *A. Rosenheim* und *M. Pritze*, B. **41**, 2708, 1908; vgl. *D. Balarew*, Chem. Centralbl. **1914**, II, 1221; **1916**, II, 1107; **1917**, II, 273.

[3]) *A. Grün* und *F. Kade*, Ber. **45**, 3361, 1912; vgl. auch *R. R. Renshaw* und *R. R. Stevens*, Chem. Centralbl. **1914**, II, 975.

[4]) Nach den Autoren ist dabei das Zwischenprodukt ein quintärer Ester, der vom Phosphorsäurehydrat $P(OH)_5$ abstammt. Derivate desselben sind auch sonst beobachtet, z. B. unter den Mineralien; nahe verwandt erscheint auch das bekannte Tetra-calciumphosphat, $Ca_4P_2O_9$. Die gegenteilige Behauptung von *S. Posternak* (C. r. **169**, 37, 1919) trifft daher nicht zu; vgl. die Diskussion (diese Zeitschr. **61**, 187, 1914) zu *Posternaks* ursprünglicher unzulänglicher Phytinformel.

[5]) *K. Langheld*, Ber. **44**, 2082, 1911.

[6]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **23**, 515, 1910; **26**, 514, 1910.

[7]) *E. Fischer*, Ber. **47**, 3196, 1914.

ist, so erhält man in 40 bis 50proz. Ausbeute den Pyro-phosphorsäure-ester. Er wird isoliert, indem man in der Kälte die Lösungen der Komponenten vermischt, nach 2 Stunden durch Destillation im Vakuum das Pyridin abtreibt und den Rückstand mit Kalilauge behandelt. Durch erneutes Eindampfen entfernt man frei gewordenes Pyridin und Wasser; aus der hinterbliebenen Salzmasse zieht 90proz. Alkohol das Di-kaliumsalz der Di-phenyl-pyro-phosphorsäure aus, das durch Umkristallisieren von anhaftenden Spuren anorganischen Phosphats sowie Kaliumchlorids gereinigt werden kann.

Diese bisher unbekannte Synthese führt zu löslichen Salzen der sehr beständigen Di-phenyl-pyro-phosphorsäure. Wir hoffen, uns dieses Verfahrens zur Bereitung anderer Phosphorsäure-ester bedienen zu können.

Die zu unseren Versuchen benutzte *Mono-phenyl-ortho-phosphorsäure* wurde in Anlehnung an Angaben von *B. Heymann* und *W. Königs*[1]) dargestellt. Für die Versuche mit den Phosphatasen gelangte ihr Dikaliumsalz der Formel $C_6H_5K_2PO_4$, zur Verwendung. Die *Di-phenyl-phosphorsäure* wurde in Gestalt ihres *Monokaliumsalzes* $(C_6H_5)_2KPO_4$ zu den Spaltungsversuchen benutzt; die Verbindung ist nach der Vorschrift von *Glutz*[2]) zugänglich.

Die *Äthyl-monophosphorsäure* ist als Bariumsalz unschwer nach der Methode von *W. Lossen* und *A. Köhler*[3]) zu beschaffen. Durch Umsetzung mit Di-kaliumsulfat entsteht eine Lösung des Kaliumsalzes, die ohne weiteres Verwendung finden kann.

II. Darstellung von Di-phenyl-pyro-phosphorsaurem Kalium.

In einem Fraktionierkolben werden in 350 ccm vollkommen trockenen Pyridins durch allmähliches Eintropfen 106 g (1,4 mol.) frisch destilliertes Phosphoroxychlorid gelöst. Zu dieser Reaktionsflüssigkeit gibt man darauf tropfenweise eine Lösung von 47 g Phenol in wenig Pyridin. Sowohl das Pyridin als auch das Phenol waren stets frisch destilliert. Beim Eintragen der Phenollösung scheidet sich nach kurzer Zeit eine weiße kristallinische Substanz aus. Um einer wesentlichen Erwärmung der Mischung vorzubeugen, kühlt man zweckmäßig durch zeitweises Eintauchen des Kolbens in Eiswasser. Nachdem das Gemisch im verschlossenen Gefäß etwa 2 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hat, wird der Überschuß an Pyridin im Vakuum bei 30 bis 35^0 abdestilliert und der Rückstand mit starker Kalilauge neutralisiert. Da

---

[1]) *B. Heymann* und *W. Königs*, B. 19, 3305, 1886; das Verfahren von *F. Zetzsche* und *M. Nachmann* (Helv. 8, 943, 1925) scheint nur zur Gewinnung von aliphatischen primären Phosphorsäure-estern geeignet zu sein.

[2]) *Glutz*, A. 143, 193, 1867.

[3]) *W. Lossen* und *A. Köhler*, A. 262, 209, 1891.

besonders anfangs wegen des im Überschuß benötigten Phosphoroxychlorids die Zerlegungs-Reaktion ziemlich heftig verläuft, muß man das Umsetzungsprodukt durch sehr gute Kühlung in einer Kältemischung vor zu großer Erhitzung bewahren. Die zunächst gelbe Farbe der wässerigen Pyridinlösung schlägt schon bei geringem Überwiegen von Ätzalkali in ganz charakteristischer Weise[1]) in ein Violett-rot um, so daß man ohne Zuhilfenahme eines Indikators den Neutralpunkt ohne weiteres zu erkennen vermag. Man gibt ein geringes Übermaß von Lauge hinzu und destilliert dann im Vakuum zusammen mit dem Pyridin das Wasser bei 35° ab. Das zurückbleibende Salzgemisch wird zur Herauslösung des Phosphorsäure-ester-salzes zwei- bis dreimal mit siedendem 90proz. Alkohol extrahiert, indem man die alkoholische Lösung noch heiß durch rasches Filtrieren an der Saugpumpe von den anorganischen Salzen trennt. Aus der alkoholischen Flüssigkeit scheidet sich beim Abkühlen bereits die Hauptmenge des di-phenyl-pyro-phosphorsauren Kaliums in schönen nadelförmigen Kristallen ab, die auch schon ziemlich rein sind. Die von dem Salze abgelaufene Mutterlauge liefert nach dem Einengen im Vakuum noch eine zweite, allerdings weniger reine Kristallisation. Zur völligen Säuberung wird das Rohprodukt aus siedendem 92proz. Alkohol umkristallisiert. Meist genügt eine einmalige solche Behandlung, um das Ester-pyrophosphat völlig von anhaftendem anorganischen Phosphat und Kaliumchlorid zu befreien. Im besten Falle erhielten wir das reine Salz bisher in einer Ausbeute von etwa 40 bis 50 Proz. der Theorie.

Das di-phenyl-pyro-phosphorsaure Kalium kristallisiert, wie schon erwähnt wurde, in wohl ausgebildeten Nadeln. Es ist recht leicht löslich in Wasser, fast unlöslich in absolutem Alkohol und vollkommen unlöslich in Äther und den anderen gebräuchlichen organischen Solventien.

Eine kleine Probe vertrug trockenes Erhitzen bis über 300°, ohne Zersetzung zu erleiden. Von Säuren und Laugen, die man bei 100° als n-Lösungen im Verhältnis von 6 Mol Säure oder Lauge auf 1 Mol di-phenyl-pyro-phosphorsaures Kalium einwirken ließ, wurde die Substanz dagegen ziemlich rasch unter Abgabe von Phenol und organischer Phosphorsäure hydrolysiert; stellte man jedoch Lösungen von gleicher Säure- und Lauge-konzentration einen Tag in den Brutschrank bei 37°, so wurde das Salz kaum zerlegt. Rein wässerige Lösungen sind völlig beständig.

Wir haben das erhaltene Pyrophosphat in vielen Analysen auf seine Zusammensetzung geprüft. Hierzu wurde es stets mehrmals aus 92proz. Alkohol umkristallisiert und im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd unter 0,3 bis 0,5 mm Druck und bei 100° bis zur völligen Gewichtskonstanz getrocknet.

---

[1]) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 71, 188, 1915.

Phosphoranalysen.

Die Bestimmungen wurden derart ausgeführt, daß die abgewogene Substanzmenge in der Platinschale mit dem 20fachen Quantum Soda-Salpeter-Mischung geschmolzen wurde. Nach zweimaligem Abdampfen der Schmelze mit starker Salpetersäure wurde mit Molybdän-Mischung gefällt und die Phosphorsäure entweder als $Mg_2P_2O_7$ oder durch Titration des gelben Molybdat-Niederschlages mit Natronlauge nach dem Vorgehen von *A. Neumann* bestimmt. Mit beiden Verfahren erzielten wir übereinstimmende Werte.

I. Substanz. 0,4247 g : 0,2344 g $Mg_2P_2O_7$. P = 15,38 Proz.
II. Substanz. 0,3044 g : 0,1688 g $Mg_2P_2O_7$. P = 15,47 Proz.
III. Substanz. 0,2271 g : verbrauchten n NaOH = 31,95 ccm.
P = 15,57 Proz.
IV. Substanz. 0,3121 g : 0,1731 g $Mg_2P_2O_7$. P = 15,46 Proz.
V. Substanz. 0,2577 g : 0,1436 g $Mg_2P_2O_7$. P = 15,53 Proz.

Kaliumbestimmungen.

Zur Ermittlung des Kaliumgehaltes bedienten wir uns der Perchloratmethode. Da das aus dem Salz frei werdende Phenol von überschüssiger Überchlorsäure in dunkel gefärbte, harzige und in Alkohol teilweise schwer lösliche Produkte übergeführt wurde, dampften wir zunächst die gewogene Substanzmenge mit konzentrierter Salpetersäure mehrmals auf dem Wasserbade ein. Hierbei wird frei werdendes Phenol in nitrierte Körper verwandelt, die in Alkohol glatt löslich waren und die Analysen nicht störten. Die Fällung des Kaliumperchlorats wurde in gewohnter Weise vorgenommen. Den Niederschlag kann man sehr zweckmäßig in einem Glas-Gooch-Tiegel mit poröser Filterplatte zur Wägung bringen.

I. Substanz. 0,3660 g : 0,2475 g $KClO_4$. K = 19,08 Proz.
II. Substanz. 0,3171 g : 0,2138 g $KClO_4$. K = 19,02 Proz.

Elementaranalyse.

Eine Verbrennung (mit Kaliumbichromat und CuO) lieferte folgende Zahlen:

0,1467 g Substanz: 0,1887 g CO_2 und 0,0348 g H_2O.

Aschenanalyse.

Bei vorsichtigem Verglühen des di-phenyl-pyro-phosphorsauren Kaliums im Quarztiegel hinterblieb als Rückstand reines Kalium-meta-phosphat.
0,2734 g Substanz ergaben 0,1586 g KPO_3.

Analysenresultate.

$C_{12}H_{10}K_2P_2O_7$.
(406)

	P	K	C	H	Asche (KPO_3)
Ber.:	15,28 Proz.	19,21 Proz.	35,47 Proz.	2,46 Proz.	58,13 Proz.
Gef.:	15,38 Proz.	19,08 Proz.	35,09 Proz.	2,65 Proz.	58,01 Proz.
	15,47 ,,	19,02 ,,			
	15,57 ,,				
	15,46 ,,				
	15,53 ,,				

Zur weiteren Sicherstellung der angenommenen Formel wurde aus dem Kaliumsalz, das, wie schon bemerkt, hervorragend gut kristallisierende *Bariumsalz* hergestellt und ebenfalls analysiert.

2,0324 g Kaliumsalz in 30 ccm Wasser wurden mit einer Lösung von 1,3174 g $BaCl_2 + 2\,H_2O$ in 10 ccm Wasser versetzt. Die Flüssigkeit erstarrte augenblicklich unter Ausscheidung des Bariumsalzes. Der Kristallbrei wurde auf der Nutsche abgesaugt, mit kaltem Wasser bis zur völligen Cl-Freiheit und darauf mit Alkohol sowie Äther ausgewaschen. Erhalten wurde fast genau die theoretische Menge an Bariumsalz.

Eine Bariumbestimmung als Bariumsulfat gab folgende Werte:

0,3099 g Substanz lieferten 0,1532 g $BaSO_4$.

$C_{12}H_{10}BaP_2O_7$. Ber.: Ba = 29,46 Proz.; gef.: Ba = 29,09 Proz.
(465,5)

Die Di-phenyl-pyro-phosphorsäure, für die wir die symmetrische Formel

$$
\begin{array}{l}
O{=}P{<}^{OC_6H_5}_{OH} \\
O \\
O{=}P{<}^{OH}_{OC_6H_5}
\end{array}
$$

in Betracht ziehen, bietet nicht nur ein Interesse wegen ihrer fermentativen Spaltbarkeit durch die Phosphatase des Tier- und Pflanzenreichs, sondern auch in rein chemischer Hinsicht. Sie ist nämlich ausgezeichnet durch ihre Fähigkeit zur Bildung vieler charakteristischer, zum Teil prachtvoll kristallisierter Salze.

Aus dem Kaliumsalz erhält man leicht die Erdalkalisalze durch doppelte Umsetzung. Sie fallen in größerer Konzentration sofort aus, in verdünnten Lösungen in typischer Weise erst beim Anwärmen; wenigstens gilt dieses für das Calcium- und Strontiumsalz. Die Schwerlöslichkeit des Bariumsalzes erinnert in gewisser Beziehung an die vom Bariumsulfat. Ein m/100 Lösung des Kaliumsalzes wird noch durch Bariumchlorid gefällt, und der Niederschlag, der zwar von Mineralsäuren gelöst wird, ist in Essigsäure schwer löslich. Wie bei der Schwefelsäure ist auch das *Benzidinsalz* des Di-phenyl-pyro-phosphats außerordentlich unlöslich; verhältnismäßig schwer löslich ist ferner das *Hydrazinsalz*.

Über die *Fällungsreaktionen* des Di-phenyl-pyro-phosphats, die zum Teil denen des Mono-phenyl-ortho-phosphats ähnlich sind, aber auch manchmal sich davon verschieden gestalten, orientiert folgende Tabelle I.

Die Lösung von *mono-phenyl-ortho-phosphorsaurem Kalium* in einer Konzentration von m/2 zeigt auch *hydrotropische Eigenschaften*[1]),

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 76, 107, 1916.

Tabelle I. Reaktionen.

	Mono-phenyl-orthophosphat m/20, 1 ccm	Di-phenyl-pyrophosphat m/20, 1 ccm		Mono-phenyl-orthophosphat m/20, 1 ccm	Di-phenyl-pyrophosphat m/20, 1 ccm
m/20 $BaCl_2$, 1 ccm	klar, auch b. Erwärmen	erstarrt nach wenigen Sekunden; in der Hitze kaum löslich	Magnesia-mischung	klar, auch beim Erwärmen	kristalline Fällung in der Hitze
m/20 $CaCl_2$, 1 „	ebenso	beim Erwärm. schwache Kristallausscheidung	m/20 Uranyl-acetat, 1 ccm	weiße Fällung, in der Hitze unlöslich	weiße Fällung, in der Hitze teilweise löslich
m/20 $MgCl_2$, 1 „	ebenso	Abscheid. eines dicken Kristallbreies i. d. Hitze	m/20 $BaCl_2$, 1 ccm		Niederschl. in viel Essigsäure unlöslich, in Salzsäure löslich
m/20 $SrCl_2$, 1 „	ebenso	klar, auch b. Erwärmen			
m/20 $BeSO_4$, 1 „	käsige Fällung nach d. Erwärmen	ebenso			
m/20 $MnSO_4$, 1 „	klar, auch in der Hitze	dicke weiße Fällung in der Hitze			
m/20 $ZnSO_4$, 1 „	ebenso	dicke weiße Fällung in der Wärme			
m/20 $CdCl_2$, 1 „	ebenso	dicke weiße Fällung in der Wärme			
m/20 Bleiacetat, 1 ccm	seidenglänzende Nadeln, in der Hitze löslich	beim Erhitz. glitzernde Kristallplättchen, die in d. Wärme nicht lösl. sind			

Tabelle I. Reaktionen (Fortsetzung).

	Mono-phenyl-orthophosphat m/2, 1 ccm	Di-phenyl-pyrophosphat m/2, 1 ccm		Monophenyl-orthophosphat m/200, 10 ccm	Di-phenyl-pyrophosphat m/200, 1 ccm
m/2 Phenylhydrazin-acetat, 2 ccm	dicke weiße Fällung	dicke weiße Fällung	m/20 essigsaur. Benzidin, 1 ccm	klar, auch beim Erwärmen	weiße kristalline Fällung
m/2 Hydrazin-hydrochlorid, 1 ccm	bald käs. Fällung, unter dem Mikroskop schlecht ausgebild. Nadelbüschel	bald charakteristisch aussehende Tafeln			
n/1 HCl . . 1 „	weiße ölige Fällung, in mehr H_2O löslich	bleibt klar			
m/20 $CaCl_2$ 5 „	klar, auch b. Erwärmen	beim Erwärmen dicke weiße Fällung			
m/20 $SrCl_2$. 5 „	ebenso	dicke weiße Fällung beim Erwärmen			
m/2 $AgNO_3$, 1 „	weiß. kristalline Fällung	weiß. kristalline Fällung			
m/20 Blei-acetat . . 1 „	Fällung zuerst amorph; dann nadelförmige Kristalle	kristalline Plättchen			

indem nämlich 1 ccm davon 0,075 ccm Amylalkohol oder 0,05 ccm Anilin glatt auflöst. 1 ccm Wasser scheidet die gelösten Substanzen in dichter Trübung wieder aus.

Eine gleich konzentrierte Lösung des *di-phenyl-pyro-phosphorsauren Kaliums* zeigte diese lösenden Eigenschaften nicht.

Mit Alkaloidsalzen geben sowohl das Ortho-salz als das Pyro-salz Fällungen, die zunächst meist harzig sind.

III. Enzymatische Spaltungen.

A. Mono-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium und monoäthyl-ortho-phosphorsaures Kalium.

Von diesen Verbindungen führen wir nur kurz folgende Daten an:

Mono-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium wurde von Taka-phosphatase innerhalb 30 Tagen zu 90,97 Proz. zerlegt, während tierisches Ferment es in einer Woche zu 56,22 Proz. spaltete.

Mono-äthyl-ortho-phosphorsaures Kalium ließ sich mit Pilz-phosphatase in 21 Tagen zu 81,62 Proz. spalten, mit tierischer Phosphatase aus Pferdeniere wurde es innerhalb von 12 Tagen zu 97,82 Proz. hydrolysiert.

Ausführlich wird Herr *R. Iwatsuru* darüber berichten.

B. Di-phenyl-pyro-phosphorsaures Kalium und di-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium.

a) Versuche mit Pilz-phosphatase.

Da die Takadiastase ein an Phosphatase reiches Enzymmaterial darstellt, wurde diese zunächst benutzt, um die beiden aromatischen Phosphorsäure-ester auf ihre Spaltbarkeit durch vegetabilisches Ferment zu prüfen.

Als Substrate dienten 1proz. Lösungen von Kaliumsalzen der Phosphorsäure-ester in destilliertem Wasser, und zwar wurde vor dem Beginn der Versuche eine Lösung von genau bekanntem Gehalt hergestellt und in entsprechender Weise auf die verschiedenen Ansätze verteilt. Zur Bindung frei werdender Säure, die eine unspezifische Hydrolyse des Esters bei langer Versuchsdauer eventuell herbeiführen konnte, wurde frisch gefälltes reines Calciumcarbonat und zur Wahrung der Sterilität 1 Proz. vom Flüssigkeitsvolumen an Toluol hinzugefügt.

Zusammen mit dem Hauptversuch wurden als Kontrollen einmal eine reine Lösung des Phosphorsäure-ester-salzes und zweitens eine Aufschwemmung des Fermentmaterials nur in Wasser unter denselben Bedingungen, d. h. im Brutschrank bei 37°, aufgehoben. Wegen der Anwendung des Calciumcarbonats konnte die abgespaltene Phosphorsäure nicht direkt mit Magnesiamischung gefällt werden, sondern es mußte die noch in organischer Bindung verbliebene Phosphorsäure auf

indirektem Wege ermittelt werden. Hierzu verfuhren wir folgendermaßen:

25,0 ccm der Reaktionsflüssigkeit wurden mit 10,0 ccm Magnesiamischung versetzt, 3 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann durch ein trockenes Filter in ein trockenes Kölbchen filtriert. Vom klaren Filtrat wurden nun 25,0 ccm genau abgemessen und in einer Platinschale zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde vorsichtig mit Soda-Salpeter-Mischung geschmolzen und die farblose Schmelze zweimal mit Salpetersäure auf dem Wasserbade abgeraucht. In der wässerigen Lösung des Rückstandes wurde dann die nunmehr in anorganischer Form vorhandene Phosphorsäure in bekannter Weise über das Phosphormolybdat als $Mg_2P_2O_7$ bestimmt.

In dieser Weise haben wir direkt nach Ansatz des Versuchs den Gesamtgehalt an organisch gebundener Phosphorsäure ermittelt und sind bei allen weiteren Analysen entsprechend verfahren. Aus dem Fermentmaterial trat niemals eine mit Magnesiamischung unter den obwaltenden Bedingungen nicht entfernbare organische Phosphorsäure-verbindung in die Flüssigkeit über; die Lösungen der Esterkaliumsalze für sich hielten sich im Brutschrank durch viele Wochen völlig unverändert.

Wenn die Spaltung im Hauptversuch annähernd beendet war, wurde auch das abgelöste Phenol quantitativ bestimmt. Wir gingen so vor, daß wir 100 ccm der Reaktionsflüssigkeit unter Zugabe von 2 g Calciumcarbonat mit Wasserdampf destillierten. Das Destillat wurde zur Bindung eventuell freigewordenen Ammoniaks einer zweiten Destillation über verdünnter Schwefelsäure unterworfen. In der nunmehr vorliegenden Flüssigkeit wurde das Phenol zunächst qualitativ mit den gewöhnlichen Mitteln (Bromwasser, Eisenchlorid und Millons-Reagenz) nachgewiesen. Die Proben fielen beim Hauptversuch stets stark positiv aus, bei den Kontrollösungen immer negativ.

Quantitativ wurde das Phenol nach der Methode von *Kossler*, *Penny* und *Neuberg*[1]) durch Titration mit Jodlösung ermittelt.

Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

a) Diphenyl-pyro-phosphorsaures Kalium.

Stammlösung. 2,0025 g Pyrophosphat in 200,0 ccm Wasser.

1.	Di-phenyl-pyrophosphatlösung	150 ccm
	Pilz-phosphatase	3 g
	Calciumcarbonat	3 g
	Toluol	1,5 ccm
2.	Pyro-ester-kaliumsalz-lösung	50 ccm
	Calciumcarbonat	1 g
	Toluol	0,5 ccm

[1]) Siehe *C. Neuberg*, „Der Harn“, S. 476.

3. Wasser . . . . 150 ccm
   Pilz-phosphatase . . . . 3 g
   Calciumcarbonat . . . . 3 g
   Toluol . . . . 1,5 ccm

Die folgende Tabelle weist den Verlauf des Spaltungsvorgangs aus.

Tabelle II.

Wirkung von Pilzphosphatase auf di-phenyl-pyro-phosphorsaures Kalium (1 proz. Lösung).

Zeit	1. Gehalt an ungespaltener Ester-phosphorsäure, ausgedrückt in g $Mg_2P_2O_7$	1. Hydrolyse Proz.	Kontrollen 2.	Kontrollen 3.
Anfangs	0,0980	0	dauernd un-gespalten	dauernd un-verändert
Nach 2 Tagen . .	0,0544	44,5		
„ 7 „ . .	0,0172	82,5		
„ 9 „ . .	0,0095	90,3		

β) Di-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium.

Diese Salz bereiteten wir unmittelbar vor Anstellung des Versuchs aus dem leicht zugänglichen Bariumsalz mit der entsprechenden Menge Di-kaliumsulfat. Die Umsetzung wurde mit abgewogenen Mengen in der Hitze im Meßkolben vorgenommen und die nach dem Filtrieren völlig klare Lösung direkt für die Versuche benutzt. Wir behandelten 3,3073 g Ba-Salz mit 1,0 g K_2SO_4 (geringer Überschuß) und erhielten 2,9994 g Kaliumsalz, die in 300 ccm Wasser gelöst waren.

1. Di-phenyl-ortho-phosphat-lösung . . . 200 ccm
   Pilz-phosphatase . . . . 4 g
   $CaCO_3$ . . . . 4 g
   Toluol . . . . 2 ccm

2. Di-phenyl-ortho-phosphat-lösung . . . 100 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 2 g
   Toluol . . . . 1 ccm

3. Wasser . . . . 200 ccm
   Pilz-phosphatase . . . . 4 g
   $CaCO_3$ . . . . 4 g
   Toluol . . . . 2 ccm

Die Spaltung gestaltete sich folgendermaßen:

Tabelle III.
Wirkung der Pilzphosphatase auf di-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium (1proz. Lösung).

Zeit	1. Gehalt an ungespaltener Ester-phosphorsäure, ausgedrückt in g $Mg_2P_2O_7$	1. Hydrolyse Proz.	Kontrollen 2.	Kontrollen 3.
Anfangs	0,0710	0	un- gespalten	un- verändert
Nach 2 Tagen . .	0,0638	10,2		
„ 22 „ . .	0,0538	24,2		

Die nach 22 Tagen vorgenommene *Phenol-bestimmung* ergab folgendes Resultat:

Das enzymatisch in Freiheit gesetzte Phenol wurde unter den notwendigen Kautelen über kohlensaurem Calcium aus 50,0 ccm Reaktionsgemisch mit Wasserdampf übergetrieben. Destillat 400,0 ccm. 100,0 ccm des letzteren verbrauchten 13,0 ccm n/10-Jodlösung. Diese zeigen 0,0815 g Phenol für 50 ccm *Urlösung* an. Da diese bei totaler Spaltung 0,3263 g freies Phenol enthalten könnten, ist die Hydrolyse zu 24,98 **Proz.** erfolgt. Diese Zahl fällt fast genau mit dem Wert zusammen, den die Analyse der abgespaltenen Quantität Phosphorsäure liefert.

γ) Di-phenyl-pyro-phosphat mit Pilz-phosphatase zur Phenolbestimmung.

Stammlösung. 2,0030 g di-phenyl-pyro-phosphorsaures Kalium in 200,0 ccm Wasser.

Di-phenyl-pyrophosphat-lösung	200 ccm
Pilz-phosphatase	6 g
$CaCO_3$	4 g
Toluol	2 ccm

Die *Phenolbestimmung*, die auf die oben erwähnte Art ausgeführt wurde, lieferte nachstehende Werte:

100 ccm des Reaktionsgemisches waren über 2 g $CaCO_3$ mit Wasserdampf destilliert; Enddestillat: 1000,0 ccm.

100 ccm wurden titriert. Verbrauchte n/10 Jodlösung 25,5 ccm. Da 1 ccm 0,001 567 g Phenol entspricht, so waren in den 100 ccm titrierter Flüssigkeit 0,03996 g und in 100 ccm Urlösung 0,3996 g Phenol enthalten. Theoretisch könnten darin sein 0,4636 g. Das Salz ist demnach zu 86,19 **Proz.** gespalten.

Eine parallel ausgeführte Phosphat-bestimmung zeigte eine Hydrolyse von 86,73 **Proz.** an, so daß vortreffliche Übereinstimmung bei der Analyse der beiden frei gewordenen Paarlinge herrscht.

b) Versuche mit tierischen Organen.

Zur Entscheidung der Frage, ob die verwendeten Phosphorsäureester auch von animalischer Phosphatase angegriffen werden, haben

wir sie der Einwirkung des Ferments aus frischer Pferdeniere[1]) ausgesetzt. Hierzu bereiteten wir zunächst einen Organextrakt, indem 250 g möglichst von Fett und Bindegewebe getrennter Pferdeniere fein zermahlen und mit 750 ccm physiologischer Kochsalzlösung unter Zugabe von 7,5 ccm Toluol einen Tag lang bei Zimmertemperatur maceriert wurden. Nach dieser Zeit wurde zentrifugiert und die schwach getrübte Flüssigkeit direkt als Lösungsmittel für die Ester-phosphorsäure-salze benutzt. Die Analysen wurden in genau derselben Weise ausgeführt, wie bei den Versuchen mit der Pilz-phosphatase. Auch aus dem tierischen Fermentmaterial wurde keine mit Magnesiamischung nicht fällbare organische Phosphorsäure-verbindung frei, da wahrscheinlich eventuell vorhandene Nucleinsäurederivate als schwer lösliche Magnesiumsalze beim Vermischen mit der Magnesiamixtur ausgefällt oder abgebaut worden waren.

a) Di-phenyl-pyro-phosphorsaures Kalium.

1. Ester-pyrophosphat . . . . 2,0012 g
   Nierensaft . . . . 200 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 4 g
   Toluol . . . . 2 ccm

2. Ester-pyrophosphat . . . . 1,0040 g
   Wasser . . . . 100 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 3 g
   Toluol . . . . 1 ccm

3. Organsaft . . . . 200 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 4 g
   Toluol . . . . 2 ccm

Den Spaltungsverlauf zeigt die Tabelle IV an.

Tabelle IV.

Wirkung von Nierenphosphatase auf di-phenyl-pyro-phosphorsaures Kalium (1 proz. Lösung).

Zeit	1. Gehalt an ungespaltener Ester-phosphorsäure, ausgedrückt in g $Mg_2P_2O_7$	1. Hydrolyse	Kontrollen	
		Proz.	2.	3.
Anfangs	0,0979	0	dauernd ungespalten	zu allen Zeiten frei von organisch gebundener Phosphorsäure
Nach 1 Tag . . .	0,0499	49,0		
„ 3 Tagen . .	0,0244	75,1		
„ 5 „ . .	0,0107	89,1		
„ 7 „ . .	0,0000	100,0		

[1]) *C. Neuberg* und *M. Behrens*, diese Zeitschr. 170, 254, 1926.

β) Di-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium.

Das Kaliumsalz wurde ebenso hergestellt wie bei den Versuchen mit Pilz-phosphatase beschrieben wurde. Die Lösung des Kaliumsalzes wurde mit dem Organextrakt in genau gemessenen Verhältnissen vermischt.

Zur Umsetzung wurden verwendet 3,3082 g Ba-Salz und 1,0 g Kaliumsulfat (geringer Überschuß) und daraus 3,0000 g Kaliumsalz erhalten; diese befanden sich in 300,0 ccm H_2O.

1. Di-phenyl-ortho-phosphat-lösung . . . 200 ccm
   Organsaft . . . . 200 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 4 g
   Toluol . . . . 4 ccm

2. Di-phenyl-ortho-phosphatlösung . . . . 100 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 2 g
   Toluol . . . . 1 ccm

3. Organsaft . . . . 200 ccm
   Wasser . . . . 200 ccm
   $CaCO_3$ . . . . 4 g
   Toluol . . . . 4 ccm

Tabelle V.

Wirkung von Nierenphosphatase auf di-phenyl-ortho-phosphorsaures Kalium (0,5 proz. Lösung).

Zeit	1. Gehalt an ungespaltener Ester-phosphorsäure, ausgedrückt in g $Mg_2P_2O_7$	1. Hydrolyse Proz.	Kontrollen 2.	Kontrollen 3.
Anfangs	0,0351	0	un-	un-
Nach 17 Tagen .	0,0094	73,23	gespalten	verändert

Die beim letzten Versuch nach 17 Tagen ausgeführte *Phenolbestimmung* ergab folgende Resultate:

50,0 ccm Urlösung lieferten 310 ccm Destillat. 100,0 ccm davon verbrauchten 25,0 ccm n/10 Jodlösung, das entspricht einem Gehalt von 0,1214 g Phenol in 50,0 ccm Urlösung, während theoretisch aus den 0,2500 g darin enthaltenen Kaliumsalzes 0,1632 g Phenol frei werden könnten.

Das Salz ist also hiernach zu **74,39 Proz.** gespalten, was sich in Übereinstimmung mit dem aus der Phosphatbestimmung ermittelten Wert befindet (siehe Tabelle V).

Zur „Bestimmung der gallensauren Salze im Blut"[1]).

(Berichtigung.)

Von

I. Lifschütz (Hamburg).

(Eingegangen am 11. März 1926.)

Die obige Methode ist durchweg aufgebaut auf dem von mir ausführlich erörterten und durch zahlreiche gut stimmende Analysen belegten Verfahren zur *spektrometrischen* Bestimmung der Gallensäuren in Gallenflüssigkeiten, das ich auch für *kolorimetrische* Bestimmungen allenfalls empfohlen hatte[2]). So anerkennenswert es ist, daß sich Herr *Szilárd* dieses bedeutsamen Problems angenommen hat, so enthält doch seine Anwendung des betreffenden Verfahrens auf die Gallensalze des *Blutes* einige Ungenauigkeiten, die richtigzustellen, ich für durchaus notwendig erachte.

1. Zunächst sei bemerkt, daß das Verfahren, *kolorimetrisch* ausgeführt, keineswegs so zuverlässig ist, wie die *Spektrometrie* der Gallensäuren vermittelst der far[illegible]gen Essigschwefelsäurereaktion. Denn die Kolorimetrie setzt bekan[illegible]tlich eine Testlösung voraus, wobei die etwaigen Fehlerquellen verdoppelt werden, mit denen wohl jede Analyse — zumal die optische — behaftet zu sein pflegt, während die in Rede stehende Spektrometrie (durch das *Grenzspektrum*) keinerlei Testlösungen beansprucht[3]).

2. Die Entfärbung von Gallensubstanzlösungen mit Tierkohle ist recht bedenklich, denn Tierkohle adsorbiert nicht nur die Pigmente, sondern auch eine Reihe anderer Substanzen, wie Alkohole, Säuren und *Salze*, während die letzteren hier doch quantitativ in der Lösung verbleiben müssen. Wie in meiner oben zitierten Arbeit (S. 385) hervorgehoben ist, wird selbst die dunkelgrüne Eisessiglösung der Ochsengalle durch das Aufkochen mit dem Benzoylsuperoxyd hinreichend entfärbt, so daß sie bei der weiteren Verdünnung mit *Chloroform* völlig farblos erscheint.

3. Eine weitere erhebliche Ungenauigkeit der zu erzielenden Analysenwerte entsteht, wenn man die in Rede stehende Farbreaktion in der Eisessiglösung der Gallensäuren, ohne sie mit *Chloroform* zu versetzen, mit der konzentrierten Schwefelsäure hervorruft. Die Reaktion ist nämlich dann viel träger und unvollständiger[4]).

---

1) *P. Szilárd*, diese Zeitschr. **159**, 325, 1925.

2) *Lifschütz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 383ff., 1914.

3) Weil der Verhältniswert des bestimmenden Objektes (der Cholsäure) eine ein für allemal festgestellte Konstante ist (s. weiter unten).

4) Siehe meine oben erwähnte Arbeit, S. 385, Anmerkung 1.

Da ich bei meiner diesbezüglichen Arbeit Ochsengalle (Fel tauri) bzw. reine Cholsäure verwendet hatte, so sei es mir gestattet, auf die Möglichkeit der Anwendung dieses Verfahrens auch auf die Gallensäuren des Blutes oder deren *Salze im Blutserum* hier kurz hinzuweisen.

Wie ich in meiner erwähnten Abhandlung (S. 391 ff.) ausführlich dargetan, lassen sich die gallensauren Salze vom Cholesterin, das ja — nach seiner Oxydation — gleichfalls die farbige Essigschwefelsäurereaktion gibt, in ihren konzentrierten alkoholischen Lösungen mit viel Äther trennen, indem sie quantitativ ausfallen, wobei das Cholesterin in Lösung bleibt. Es empfiehlt sich aber, diese Fällung der Salze zu wiederholen, bis das alkoholisch-ätherische Filtrat, nach dem Eindampfen einer Probe, mit etwas Chloroform aufgenommen, mit Acetanhydrid verdünnt und mit 2 bis 3 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt, keine Grünfärbung bzw. kein Absorptionsspektrum mehr gibt[1]).

Die so gewonnene Gallensalzmasse wird für die Spektrometrie genau so behandelt, wie das trockne „Fel tauri" in meiner erwähnten Arbeit (S. 385 ff.). Die dabei festgestellte „*spektrale Grenzempfindlichkeit*" (G) braucht bloß mit 100 multipliziert und durch 9025[2]) dividiert zu werden, um im Quotienten den Prozentgehalt (x) der Salzmasse an reiner Cholsäure zu erhalten, nach der Proportionalgleichung $9025 : G = 100 : x$.

---

[1]) Es ist darauf zu achten, daß das verwendete Blutserum keine freien Säuren enthält, die gegebenenfalls mit NaOH neutralisiert werden müssen.

[2]) Diese Zahl ist die in obiger Arbeit ein für allemal festgestellt „*spektrale Grenzempfindlichkeit*" der reinen Cholsäure.

Autorenverzeichnis.

